

Aus dem Institut für Pathologie und Funktionsbereich Cytopathologie
Funktionsbereich Cytopathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik an
Pleuraergüssen unter Berücksichtigung adjuvanter Methoden

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Fink

2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Ilse P, Biesterfeld S, Pomjanski N, Fink C, Schramm M:
SHOX2 DNA methylation is a tumour marker in pleural effusions.
Cancer Genom Proteom 2013; 10: 217-223

Zusammenfassung

Die letzten Arbeiten, die sich ausschließlich mit der Treffsicherheit der Zytologie an Pleuraergüssen auseinandergesetzt haben, sind mittlerweile schon mehr als zehn Jahre alt. Deshalb sollen in der vorliegenden explorativen Studie nun aktuelle Daten gewonnen werden. Insbesondere soll geklärt werden, wie hoch die Treffsicherheit der morphologiebasierten zytologischen Untersuchung (Basiszytologie) bei der Diagnostik von malignen in Abgrenzung zu benignen Pleuraergüssen ist und welchen diagnostischen Zugewinn die Anwendung von adjuvanten Methoden zusätzlich zur Basiszytologie erbringt. Als adjuvante Methoden kommen immunzytochemische Verfahren sowie die DNA-Bildzytometrie, Fluoreszenz in situ Hybridisierung und AgNOR-Analyse zur Anwendung. Des Weiteren soll untersucht werden, wie hoch die Treffsicherheit der immunzytochemischen Tumortypisierung nach positiver zytologischer Diagnose ist.

Dazu wurde eine Patientenkohorte erstellt, die alle Pleuraerguss-Ersteinsendungen von Patienten der siebzehn größten Einsender in die Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von Januar 2010 bis August 2011 enthält. Anschließend wurde ein klinisches Follow-Up erhoben, ein Referenzstandard nach vorab definierten Kriterien bestimmt und die zytologischen Diagnosen mit diesem verglichen. So ergab sich eine Kohorte mit 1437 Patienten, 54,3% (n=780) davon männlich und 45,7% (n=657) weiblich.

Von diesen Patienten waren nach unseren Referenzstandardkriterien 37,1% (n= 533) tumorpositiv und 62,9% (n= 904) tumornegativ. Die Basiszytologie erzielte je nach Wertung der zytologisch unklaren Fälle eine Sensitivität von 49,16- 59,84% und eine Spezifität von 94,24-100% bezüglich der Diagnose einer Pleurabeteiligung eines malignen Tumors. Die Gesamttreffsicherheit beträgt 81%. Durch den Einsatz der adjuvanten Methoden nach erfolgter Basiszytologie konnten 75% der vorher unklaren Fälle aufgeklärt werden, das heißt eine Aussage dazu gemacht werden, ob ein maligner Tumor vorliegt oder eine andere Ursache für den Pleuraerguss verantwortlich ist. Die immunzytochemische Tumortypisierung bei positiver Zytologie war zu 94,4% korrekt.

Abkürzungen

ABC= Avidin Biotin Komplex

Ag= Argentum= Silber

APAAP= Alkalische Phosphatase Antialkalischer Phosphatase Komplex

BerEp4= epitheliales Membranantigen

CD= Cluster of Differentiation

CD20= transmembranäres, nicht glycosyliertes Protein, welches auf Präkursor- und reifen B-Lymphozyten exprimiert wird

CD 45R= transmembranäres, Glykoprotein, welches auf T-Lymphozyten exprimiert wird

cdx 2= "Colonmarker" (Transkriptionsfaktor, der die Proliferation und Differenzierung der intestinalen Mukosa reguliert)

CEA= Carcinoembryonales Antigen

CK= Zytokeratin

DNA= Deoxyribonucleic acid

FISH= Fluoreszenz in situ Hybridisierung

HCl= Chlorwasserstoff (Salzsäure)

HEA= epitheliales Membranantigen, Kreuzreaktion zu BerEP4

Her2neu= human epidermal growth factor 2

HHU= Heinrich-Heine-Universität

LDH= Laktatdehydrogenase

MGG= May Grünwald Giemsa

NOR= nukleäre Organisationsregionen

NPW= negativer prädiktiver Wert

PAP= Papanicolaou-Färbung [in Zusammenhang mit Routinefärbungen]

PAP= Peroxidase Anti Peroxidase Komplex [in Zusammenhang mit Immunzytochemie]

PPW= positiver prädiktiver Wert

TTF 1= Thyreoidaler Transkriptionsfaktor 1

pos= positiv

dV= dringender Verdacht

zw= zweifelhaft

neg= negativ

Abbildungen

Abbildung 1 Ätiologie der Pleuraergüsse nach Häufigkeit; erstellt nach den Daten von Hausheer und Yarbro, 1985.....	6
Abbildung 2 Flussdiagramm nach R.W. Light (2002), klinisches Vorgehen bei der Diagnose eines Pleuraergusses.....	8
Abbildung 3 Patientenkohorte gesamt und nach Abschluss des Follow-Up.....	23
Abbildung 4 Patientenkohorte nach Berücksichtigung des Referenzstandards (RS).....	24
Abbildung 5 Zugeschnittenes Bildschirmabbild des zur Nachuntersuchung verwendeten Fragebogens...	27
Abbildung 6 Patientenkohorte nach klinischem Follow-Up mit Referenzstandard in %.....	37
Abbildung 7 Prozentuale Verteilung der zytologischen Diagnosen an Hand der Patientenkohorte nach Follow-Up und Berücksichtigung der Ausschlusskriterien des Referenzstandards.....	38
Abbildung 8 Geschlechtsspezifische Verteilung der Pleuraergüsse laut Follow-Up.....	39
Abbildung 9 Verteilung der Pleuraergüsse nach zytologischer Diagnose in %	40
Abbildung 10 Geschlechtsspezifische Verteilung der Pleuraergüsse (maligne u. benigne) in %	41
Abbildung 11 Häufigkeitsverteilung der Pleuraergüsse insgesamt nach Lokalisation (Angaben der Klinik).....	42
Abbildung 12 Häufigkeitsverteilung der Pleuraergüsse nach Lokalisation nach initialer Zytologie.....	43
Abbildung 13 Altersverteilung der positiven und negativen Pleuraergüsse im Untersuchungszeitraum laut Referenzstandard	44
Abbildung 14 Die am häufigsten in die Pleura metastasierenden Tumore	45
Abbildung 15 Die am häufigsten in die Pleura metastasierenden Tumore bei Frauen.....	46
Abbildung 16 Die am häufigsten in die Pleura metastasierenden Tumore bei Männern	47
Abbildung 17 Sensitivität und Spezifität der alleinigen morphologiebasierten Zytologie anhand der verschiedenen Auswertungsvarianten (dV= dringender Verdacht; zw= zweifelhaft).....	49
Abbildung 18 Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit adjuvanten Methoden anhand der verschiedenen Auswertungsvarianten (dV= dringender Verdacht; zw= zweifelhaft).....	52
Abbildung 19 Sensitivität und Spezifität der adjuvanten Methoden alleine.....	53
Abbildung 20 Durch adjuvante Methoden aufgeklärte Fälle in %	54
Abbildung 21 Treffsicherheit adjuvanter zytologischer Methoden bei der Tumortypisierung %.....	55

Tabellen

Tabelle 1 Lokalisation des Primarius bei malignem Pleuraerguss Studien von 1975-2012 (Atunes 2003 und Gupta 2012).....	5
Tabelle 2 Nomenklatur der deutschen Gesellschaft für Pathologie und Zytologie für die Erstellung von Befunden in der extragenitalen Zytologie (Böcking, 1998)	11
Tabelle 3 Häufig in der Cytopathologie der HHU verwendete Marker (Pomjanski et al. 2005)	13
Tabelle 4 Treffsicherheit der Zytologie an Pleuraergüssen. Studien von 1966-1985 (nach Spriggs und Boddington 1989)	17
Tabelle 5 Treffsicherheit der Ergusszytologie. Studien von 1990-2008.....	18
Tabelle 6 Studien von Motherby und Grefete zur Treffsicherheit adjuvanter Methoden im Vergleich zur morphologiebasierten Zytologie (ICC= Immunzytochemie)	20
Tabelle 7 Studien von Metzgeroth und Yahya zeigen die morphologiebasierte Zytologie und der Zugewinn an Treffsicherheit durch die Immunzytochemie (ICC).....	20
Tabelle 8 Studien von 2001-2013 zur Treffsicherheit der Immunzytochemie alleine.....	21
Tabelle 9 Liste der eingesetzten Antikörper	33
Tabelle 10 Die Vierfeldertafel als Grundlage zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität (Baenkler und Fritze, 1999).....	34
Tabelle 11 Auswertungsvarianten zur Sensitivität und Spezifität der alleinigen morphologiebasierten Zytologie (bei verschiedener Beurteilung zweifelhafter und dringend verdächtiger Fälle	48
Tabelle 12 In der vorliegenden Kohorte angewandte adjuvante Methoden.....	50
Tabelle 13 Immunzytologisch eingesetzte Marker.....	50
Tabelle 14 Auswertungsvarianten zur Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit adjuvanter Methoden. 51	
Tabelle 15 Gesamttreffsicherheit, positiver und negativer prädiktiver Wert, Sensitivität und Spezifität der adjuvanter Methoden alleine	53
Tabelle 16 Durch eine adjuvante zytologische Methode falsch diagnostizierte Fälle	55
Tabelle 17 Nach Follow-Up zytologisch falsch typisierte Tumore.....	56
Tabelle 18 Zusammenfassung der Ergebnisse von Salyer 1975, Chernow 1977, Johnston 1985, Sears 1987, Hsu 1987 und Gupta 2012 zur Lokalisation der am häufigsten für maligne Pleuraergüsse verantwortlichen Primärtumore	60
Tabelle 19 Gegenüberstellung von konventioneller Zytologie und der Kombination aus konventioneller Zytologie und adjuvanter Methoden für die drei unterschiedlichen Auswertemodi.....	66
Tabelle 20 Durch adjuvante Methoden falsch typisierte Fälle	68

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Pleura. Anatomie/Physiologie/Funktion	2
1.2	Pleuraergüsse.....	3
1.2.1	Einteilung.....	3
1.2.2	Ätiologie.....	4
1.2.3	Symptome	6
1.2.4	Klinik.....	6
1.2.5	Therapie	9
1.3	Zytologische Diagnostik	10
1.3.1	Adjuvante Methoden.....	11
1.3.1.1	Immunzytochemie.....	12
1.3.1.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH).....	13
1.3.1.3	AgNOR-Analyse.....	14
1.3.1.4	DNA-Bildzytometrie.....	14
1.3.2	Treffsicherheit der Ergusszytologie	16
1.4	Zielsetzung.....	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Patientenkohorte.....	22
2.2	Ethikvotum	24
2.3	Erstellung des Follow-Up Bogens	25
2.4	Datenerhebung für die klinische Nachuntersuchung (Follow-Up)	28
2.5	Definition eines Referenzstandards für eine maligne Ergussursache .	29
2.5.1	Positivkriterien des Referenzstandards	29
2.5.2	Negativkriterien des Referenzstandards.....	29
2.6	Adjuvante Methoden zur Tumortypisierung.....	30
2.6.1	Definition der Kohorte für die Tumortypisierung	30

2.6.2	Durchführung adjuvanter Methoden am Schwerpunkt Cytopathologie der HHU Düsseldorf.....	31
2.6.3	Immunzytochemie	31
2.6.4	Weitere adjuvante Methoden.....	34
2.7	Statistische Auswertung.....	34
2.7.1	Vierfeldertafel	34
2.7.2	Sensitivität	35
2.7.3	Spezifität.....	35
2.7.4	Positiver und negativer prädiktiver Wert.....	35
2.7.5	Die Gesamtreffsicherheit (GT).....	36
2.7.6	Ziele der statistischen Auswertung	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Befunde nach Follow-Up und Berücksichtigung des Referenzstandards	37
3.2	Geschlechtsspezifische Verteilung der Ergussursachen laut Follow-Up.	40
3.3	Lokalisation der Pleuraergüsse.....	42
3.4	Verteilung der Pleuraergüsse nach Patientenalter.....	43
3.5	Lokalisation des Primarius bei malignem Pleuraerguss.....	45
3.6	Treffsicherheiten der Zytologie.....	47
3.6.1	Treffsicherheiten der alleinig morphologiebasierten Zytologie (Basiszytologie)	48
3.6.2	Treffsicherheiten der alleinig morphologiebasierten Zytologie (Basiszytologie) mit adjuvanten Methoden	49
3.6.3	Sensitivität und Spezifität der adjuvanten Methoden alleine.....	52
3.7	Aufklärungsquote zweifelhafter und dringend verdächtiger Fälle durch adjuvante Methoden.....	54
3.8	Treffsicherheit adjuvanter zytologischer Methoden bei der Tumortypisierung	55

4	Diskussion	57
4.1	Kohorte	58
4.2	Lokalisation der häufigsten eine Pleurakarzinose verursachenden Primärtumore	59
4.3	Treffsicherheit der Basiszytologie	61
4.3.1	Fazit der verschiedenen Auswertungen über die Treffsicherheit der Basiszytologie.....	62
4.4	Zugewinn an Treffsicherheit der Zytologie durch adjuvante Methoden	64
4.5	Treffsicherheit der adjuvanten Methoden alleine	67
4.6	Einsatz adjuvanter Methoden zur Tumortypisierung	68
4.7	Definition des Referenzstandards	71
4.8	Schlussfolgerung	73
5	Literaturverzeichnis	74

1 Einleitung

Die Zahl der pro Jahr neu aufgetretenen Krebserkrankungen in Deutschland hat nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts in den Jahren von 1980-2006 bei Frauen um rund 35%, bei Männern sogar um mehr als 80% zugenommen. Die Ursache hierfür sieht das Robert-Koch-Institut 2010 (Krebs in Deutschland 2005/2006) in der veränderten Altersstruktur der Bevölkerung (demografischer Wandel), wobei bei Männern durch die stark zunehmende Verwendung der Prostatastanzdiagnostik insbesondere die Zahl der erkannten Prostatakarzinome stark zugenommen hat.

Im Gegensatz zu den stark steigenden Neuerkrankungsraten nahmen die altersstandardisierten Krebssterberaten sowohl für Frauen als auch für Männer gleichermaßen um mehr als 20% ab (Husmann et al., 2010). Dies ist sicherlich der Verbesserung der onkologischen Therapie in den letzten 30 Jahren zu verdanken, aber natürlich auch einer stetigen Weiterentwicklung und Verbesserung der heutigen Tumordiagnostik, aus der eine Tumorentdeckung in früheren, häufiger kurativ zu behandelnden Tumorstadien resultiert.

So beinhalten auch die Ziele der Zytologie als wichtiger Bestandteil bei der Früherkennung eines malignen Geschehens, durch ständige Weiterentwicklung bestehender Methoden, aber auch durch den Einsatz neuer Methoden ihre Sensitivität und Spezifität zu verbessern.

Eine herausragende Bedeutung kommt der Zytologie unter anderem als Routineuntersuchung bei der Pleuraergussdiagnostik zu. Sie stellt hier den „Goldstandard“ dar. Es ist oft die Zytologie, die eine Karzinose der Pleura diagnostiziert bzw. eine sich erst durch einen Pleuraerguss manifestierende maligne Erkrankung offenlegt (Bedrossian, 1994). So kommt der Treffsicherheit der Zytologie bei der Abklärung der Ursache eines Pleuraergusses eine große klinische Bedeutung zu, besonders wenn man die Ergebnisse von Hausheer und Yabro (1985) betrachtet, die besagen, dass in knapp 40% der Fälle ein maligner Tumor für einen Pleuraerguss verantwortlich ist. Sieht man dies in Verbindung zu den in der Literatur angegebenen mittleren Überlebensraten bei durch ein Mammakarzinom verursachtem malignen Pleuraerguss von nur 6-36 Monaten (Gasparri et al., 2006) bzw. von 16-42 Monaten (Neragi-Miandoab, 2008), (Fentiman et al., 1981) oder bei einem durch ein Lungenkarzinom verursachten, malignen Pleuraerguss von durchschnittlich gerade einmal 16 Wochen (Barbetakis et al., 2004, Antunes et al., 2003, Antony et al., 2001), so ist es von größter Bedeutung, die erkrankten Patienten so früh wie möglich zu therapieren.

1.1 Die Pleura. Anatomie/Physiologie/Funktion

Die Pleura zählt zu den serösen Häuten, den *Tunicae serosae*, und ist aufgebaut aus einer dünnen Bindegewebsschicht, überzogen von einem einschichtigen Mesothel. Sie bedeckt die Lungen, das Zwerchfell und das Mediastinum und kleidet die innere Thoraxwand aus.

Sie gliedert sich in zwei unterschiedlich große, die Lungen enthaltende und durch das Mediastinum voneinander getrennte Pleurahöhlen. Die beiden Höhlen zählen somit wie auch die Perikard- und die Peritonealhöhle zu den serösen Körperhöhlen. Durch die Serosaauskleidung erhält die Pleura ihre hellrote und spiegelnde Oberfläche.

Die Pleura gliedert sich in zwei Blätter- ein viszerales Blatt, die *Pleura visceralis* (Synonyme: *Pleura pulmonalis* oder Lungenfell), welches die Lungen überzieht, und ein parietales Blatt, die *Pleura parietalis* (Synonyme: *Pleura costalis* oder Rippenfell), welches die Innenseite des Thorax überzieht (Moll und Moll, 2006). Zwischen den beiden Blättern liegt der Pleuraspalt, der beim Gesunden ca. 8,4+/-4,3ml seröse Flüssigkeit enthält (Noppen et al., 2000). Die Hauptbestandteile dieser Flüssigkeit sind Leukozyten, Erythrozyten und Proteine. Die Pleuraflüssigkeit gelangt durch Druckunterschiede über Transsudation aus den Gefäßen der *Tunica serosa* in den Pleuraspalt, sodass sich ein dünner Flüssigkeitsfilm bildet, welcher durch Adhäsionskräfte ein Auseinanderziehen der beiden Pleurablätter voneinander unterbindet, gleichzeitig aber die Verschieblichkeit der Pleurablätter gegeneinander erlaubt. Diese ermöglicht es den Organen bei Volumenänderungen, wie sie z.B. bei der Atmung auftreten, innerhalb der Körperhöhle zu gleiten. So kann sich die Lunge bei der Inspiration ausdehnen und über das parietale Blatt gleiten.

Die Resorption der Pleuraflüssigkeit erfolgt über Lymphgefäße in der *Pleura parietalis* (Moll und Moll, 2006). In Zusammenschau der Studien von Stewart (Stewart, 1963) sowie Leckie und Tothill (Leckie und Tothill, 1965) kann man beim gesunden Patienten in etwa von einer lymphatischen Resorption der Pleuraflüssigkeit von 20ml/Std. bzw. 500ml/Tag ausgehen.

Im Pleuraspalt herrscht ein Unterdruck, der zwischen -3 mm Hg (Inspiration) und -6mmHg (Expiration) variiert. Der Unterdruck verhindert zum einen, dass die Alveolarräume der Lunge kollabieren und sorgt zum anderen dafür, dass die Lunge den Atembewegungen des Thorax und des Zwerchfell folgen muss (Moll und Moll, 2006).

1.2 Pleuraergüsse

Unter einem Pleuraerguss versteht man eine pathologische Flüssigkeitsansammlung in der Pleurahöhle. Pleuraergüsse sind ein weit verbreitetes Krankheitsbild. So berichtet Light von jährlich ca. 1,4 Millionen Pleuraergüssen in den USA (Light, 2002).

In der Literatur sind über 50 verschiedene Erkrankungen dokumentiert, die einen Pleuraerguss verursachen können (Bedrossian, 1994). Die Ergussflüssigkeit spielt in vielen Fällen eine wesentliche Rolle bei der Findung der Krankheitsursache. Da in etwa bei 40% der Ergüsse ein malignes Geschehen als Ursache gesehen wird kommt einer frühen und schnellstmöglichen Diagnostik eine hohe Bedeutung zu (Bedrossian, 1994, Haam, 1977, Hausheer und Yarbro, 1985), vor allem, da die Überlebenszeit nach Diagnose eines malignen Pleuraergusses bei unter einem halben Jahr liegt (Sears und Hajdu, 1987, Gushchin et al., 2007).

So wird der Erguss bzw. das Pleurapunktat verschiedensten diagnostischen Testverfahren unterzogen. Hierbei spielt die zytologische Untersuchung eine entscheidende Rolle, die in 45% der tumorpositiven Fälle den ersten Hinweis auf eine maligne Ergussursache liefert (Bedrossian, 1994).

1.2.1 Einteilung

Zur Vollständigkeit erfolgt hier noch eine Aufführung der allgemeinen Einteilung von Pleuraergüssen. Diese Einteilungen sind für die spätere Diagnose des Kliniklers wichtig, allerdings haben sie keinen Einfluss auf die zytopathologische Diagnostik, weswegen in dieser Arbeit auf das Einordnen in diese Kategorien später verzichtet wird.

Nach ihrem Proteingehalt teilt man die Ergüsse in Transsudate (<30g/l) und Exsudate (>30g/l) ein.

Transsudate sind nicht entzündlich und entwickeln sich in der Regel durch eine Erhöhung des hydrostatischen Gefäßdrucks (Herzinsuffizienz, Leberzirrhose) oder durch einen verminderten onkotischen Druck (Hypoproteinämie bei nephrothischem Syndrom).

Exsudate entwickeln sich meistens durch entzündliche Veränderungen in der Pleura selbst oder in den angrenzenden Geweben. Der Erguss entsteht hier in erster Linie durch eine erhöhte Kapillarpermeabilität.

Nach ihrem Inhalt kann man Pleuraergüsse noch als Hämato-, Sero- und Chylothorax oder, wenn Eiter nachgewiesen wurde, als Empyem einteilen.

1.2.2 Ätiologie

Die häufigsten Ursachen für einen entzündlichen Pleuraerguss sind die Pleuritis oder die Pneumonie (Hausheer und Yarbro, 1985). Ursächlich sind oft bakterielle, virale, mykotische, parasitäre oder auch tuberkulöse Infektionen.

Andererseits können auch entzündliche systemische Erkrankungen wie Kollagenosen, Sarkoidose, gastrointestinale Erkrankungen, aber auch Operationen und Traumata sowie Berufskrankheiten wie die Asbestose zu Ergüssen in der Pleurahöhle führen.

Ergüsse, die durch Veränderungen des hydrostatischen oder onkotischen Drucks entstehen, sind meist durch eine Herzinsuffizienz bedingt, können aber auch von einer Leberzirrhose oder einem nephrotischen Syndrom verursacht worden sein. Ein Hämatothorax geht meist mit einem recht frischen Trauma einher, kann aber in seltenen Fällen auch tumorassoziiert auftreten. Ein Chylothorax findet seine Ursache in einer Abflußstörung des Ductus thoracicus. (Baenkler und Fritze, 1999).

Neoplasien sind mit 40-45%, (Bedrossian, 1994, (Hausheer und Yarbro, 1985) die häufigste Ursache für Pleuraergüsse.

Betrachtet man die malignen Pleuraergüsse nach Lokalisation des Primarius, liegt dieser bei Frauen und Männern zusammenbetrachtet am häufigsten in der Lunge (35,8%), gefolgt von Mammakarzinomen (17,5%) Lymphomen bzw. Leukämien (11,9%), malignen Tumoren des Urogenitaltrakts (9,4%) und des Gastrointestinaltraktes (6,1%). 11% der Tumore haben einen unbekanntem Ursprungsort (CUP). 8,3% sind anderen Tumorarten zuzuordnen. (Salyer, 1975, Chernow, 1977, Johnston, 1985, Sears, 1987, Hsu, 1987, Gupta, 2012).

In Tabelle 1 auf der folgenden Seite sind die Ergebnisse der einzelnen Studien getrennt voneinander aufgeführt.

Tabelle 1 Lokalisation des Primarius bei malignem Pleuraerguss Studien von 1975-2012 (Atunes 2003 und Gupta 2012)

Primär-tumor	Salyer 1975 (n=95)	Chernow 1977 (n=96)	Johnston 1985 (n=472)	Sears 1987 (n=592)	Hsu 1987 (n=785)	Gupta 2012 (n=400)	Total (%)
Lunge	42	32	168	112	410	110	874(35,8)
Brust	11	20	70	141	101	84	427(17,5)
Lymphome	11	-	75	92	56	56	290(11,9)
CUP	17	13	48	76	65	50	269(11)
Urogenital	-	13	57	51	70	38	229(9,4)
GIT	-	13	28	32	68	8	149(6,1)
Andere	14	5	26	88	15	54	202(8,3)

GIT= Gastrointestinaltrakt, CUP= Carcinoma of unknown primary

Betrachtet man Frauen und Männer getrennt voneinander, so sind bei Frauen das Mammakarzinom (37,4%) und bei Männern das Lungenkarzinom (49,1%) die häufigsten Ursachen für einen malignen Pleuraerguss (Johnston, 1985).

Bei Kindern (0-17Jahre) sind Pleuraergüsse meist gutartig (Hallman und Geisinger, 1994). Dies zeigt auch die Studie von Utine et al. (2009), in der 492 pädiatrische Pleuraergüsse untersucht wurden, von denen lediglich 19 Ergüsse maligne waren. Epidemiologische Angaben zu Primärtumoren maligner pädiatrischer Ergüsse sind hier auf Grund der publizierten geringen Fallzahlen nicht zu machen.

Primärtumore der Pleura sind eher selten. Als von der Pleura ausgehender maligner Tumor ist v.a. das Pleuramesotheliom, welches für etwa 1-2% der malignen Pleuraergüsse verantwortlich ist, zu nennen (Travis et al., 2004, Churg et al., 2006, Ehya, 1986).

In Abbildung 1 sind die verschiedenen Ursachen, die für die Entstehung eines Pleuraergusses verantwortlich gemacht werden können, nach Häufigkeit ihres Auftretens sortiert, gemäß den Angaben nach Hausheer und Yabro (1985) aufgeführt.

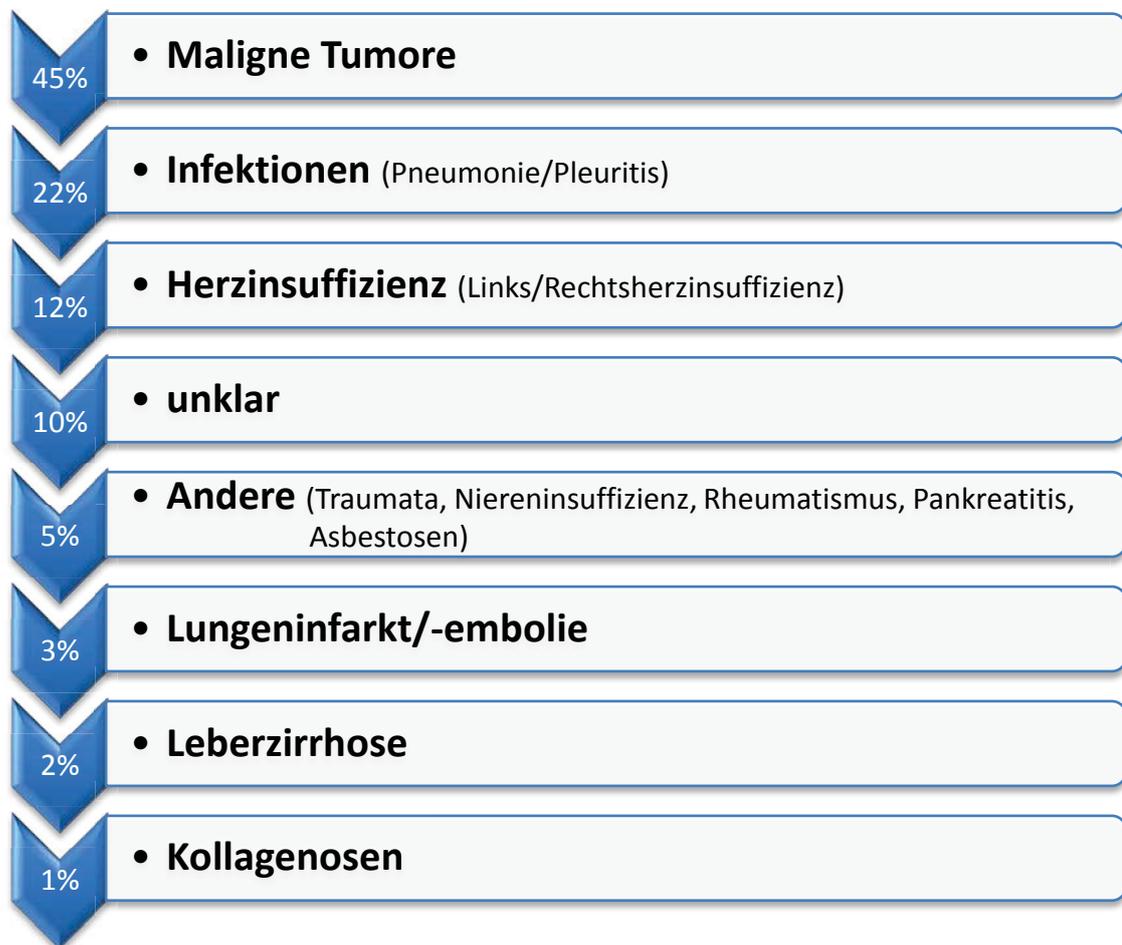


Abbildung 1 Ätiologie der Pleuraergüsse nach Häufigkeit; erstellt nach den Daten von Hausheer und Yabro, 1985

1.2.3 Symptome

Das Leitsymptom eines größeren Pleuraergusses ist die Dyspnoe (Antunes, 2003). Des Weiteren können atemabhängige Thoraxschmerzen und Husten auftreten (Hentrich, 1997). Bei entzündlichen Ergüssen wird zudem oft Fieber beobachtet. Kleinere Ergüsse können durchaus asymptomatisch bleiben (Dennis und Barry, 2008).

1.2.4 Klinik

Bei der klinischen Untersuchung findet man eine Klopferschalldämpfung mit abgeschwächtem Atemgeräusch, wenn sich die Ergussvolumina einer Größe von 500ml annähern. Außerdem können ein Kompressionsatmen sowie ein Pleurareiben auftreten. Röntgenologisch zeigt sich der Pleuraerguss als eine Verschattung. Bei

Pleuraverklebungen entwickeln sich umschriebene, gekammerte Ergüsse, die röntgenologisch wie Rundherde imponieren können.

Das empfindlichste Verfahren bei der Diagnostik eines Pleuraergusses ist die Thoraxsonographie, mit der schon kleinste Ergüsse von 30-50ml sichtbar werden. Zum Vergleich werden im konventionellen Thoraxröntgen Ergüsse erst bei einem Volumen von 300 ml offenbar (Pokieser et al., 2001). Bei Verdacht auf ein tumoröses Geschehen sollte die Bildgebung durch ein CT und/oder eine Bronchoskopie erweitert werden. Kann nach Durchführung aller genannter Maßnahmen die Ursache des Ergusses nicht geklärt werden, stellt sich ggfls. die Indikation zu einer Thorakoskopie oder offenen Pleurabiopsie (Baenkler und Fritze, 1999).

Bei allen unklaren Pleuraergüssen wird eine Pleurapunktion erforderlich. Sie ist wenig invasiv und kann auch ambulant durchgeführt werden. Durch ihren geringen Aufwand bei gleichzeitig hohem Nutzen ist sie für die weiterführende Diagnostik, aber auch für therapeutische Zwecke obligat. Denn sie vermeidet so weit wie möglich eine funktionelle Beeinträchtigung der Lunge und sichert die Atmung des Patienten. Sie sollte am tiefsten Punkt der Pleurahöhle erfolgen, da die diagnostisch relevanten Zellen dorthin sedimentieren. Es sollten in einer Sitzung nicht mehr als 1,5l abgesaugt werden, da sonst die Gefahr eines Lungenödems besteht (Thomsen et al., 2006). Die Punktionsflüssigkeit wird in der Regel zur weiterführenden Diagnostik in die Zytopathologie und die Mikrobiologie übersandt.

Der Ablauf des klinischen Vorgehens bei Vorliegen eines Pleuraergusses wird umseitig in Abbildung 2 in Form eines Flussdiagramms dargestellt.

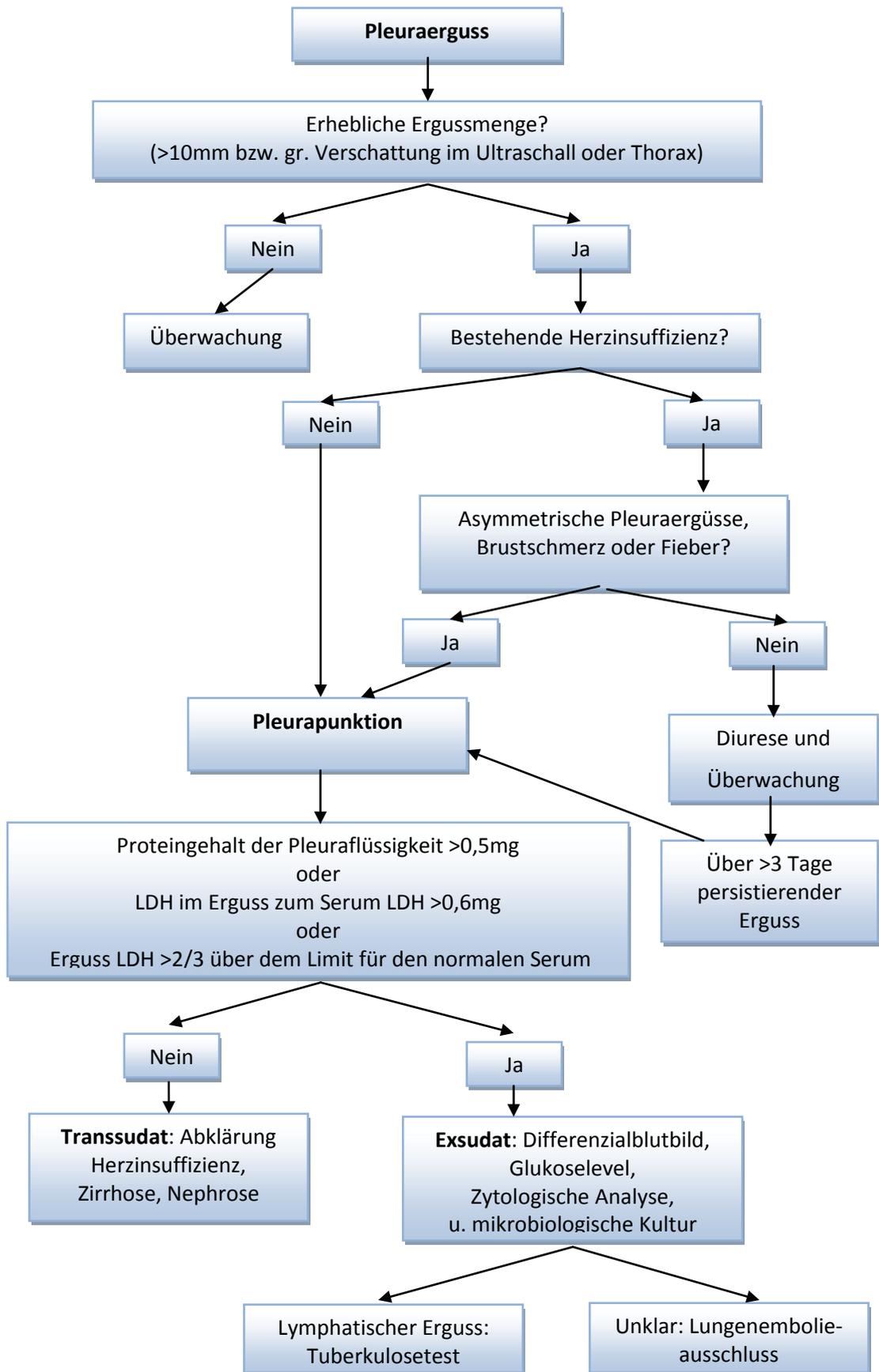


Abbildung 2 Flussdiagramm nach R.W. Light (2002), klinisches Vorgehen bei der Diagnose eines Pleuraergusses

1.2.5 Therapie

Um die Atmung des Patienten zu sichern und ein Kollabieren der Lunge zu verhindern, eventuelle Thoraxschmerzen zu ersparen und zu diagnostischen Zwecken ist eine Entlastung der Pleurahöhle indiziert. So sind größere, ausgedehnte Ergüsse durch eine Pleurapunktion oder durch das Legen einer Pleuradrainage zu entleeren. Kontraindikationen, die gegen eine Punktion sprechen, sind nicht behebbare Gerinnungsstörungen. (Pokieser et al., 2001).

Wenn es durch die erhöhte Flüssigkeitsansammlung im Pleuraspalt zu einer respiratorischen Insuffizienz kommt oder diese droht, ist eine Pleuradrainage indiziert. Dazu wird ein Thoraxkatheter eingeführt, der an ein Absaugsystem (Bülau-Drainage) angeschlossen wird. Das Absaugsystem sorgt dafür, dass sich die Lunge wieder entfaltet, dass keine Luft in den Pleuraspalt gelangt und dass die Flüssigkeit abfließen kann. Allerdings birgt eine Thoraxdrainage auch Gefahren, so ist die am häufigsten auftretende Komplikation der Pneumothorax. In seltenen Fällen kann es aber auch zu einem Hämatothorax kommen, die Milz oder Leber können verletzt werden oder eine iatrogene Superinfektion auftreten (Rieger, 2004).

In der Regel richtet sich die Therapie von Pleuraergüssen nach dem Grundleiden. Bei tuberkulöser Pleuritis wird eine medikamentöse antituberkulöse Kombinationstherapie mit evtl. initialer Kortikoidtherapie eingesetzt. Pleuraempyeme dagegen benötigen in der Regel eine Pleuradrainage und längerfristige Spülbehandlung, sowie eine gezielte antibiotische Therapie. Bei Kollagenosen oder Sarkoidose erfolgt ggfls. eine Kortikoidtherapie. Liegt eine Pleurakarzinose vor, so bietet sich (abhängig vom konkreten Primärtumor) eine zytostatische oder Hormontherapie, in manchen Fällen auch eine chirurgische Therapie, an. Können hierdurch rezidivierende maligne Pleuraergüsse nicht beherrscht werden, ist eine Pleurodese möglich. Hierbei handelt es sich um das Herbeiführen einer Obliteration der Pleura („Verklebung der Pleurablätter“). Diese kann sowohl mechanisch im Zuge einer offenen Pleurektomie oder durch Applikation eines sklerosierenden Agens erfolgen. Von den sklerosierenden Agentien hat Talkum die beste Wirksamkeit mit einer Erfolgsquote von 95% (Daniel et al., 1990, Hartman et al., 1993, Tschopp et al., 1997). Neben Talkum können auch Tetrazyklin, Doxycilin, Zytostatika und Fibrin verwendet werden (Walker-Renard et al., 1994, Pokieser et al., 2001). Es erfolgt zunächst die Entleerung des Ergusses, woraufhin wiederholt z.B. 500mg Tetrazyklin-HCl instilliert wird. Alternativ kann auch im

Rahmen einer Thorakoskopie eine Talkum-Poudrage durchgeführt werden (Baenkler und Fritze, 1999).

1.3 Zytologische Diagnostik

Die diagnostische Treffsicherheit der Ergusszytologie ist abhängig von der Menge des flüssigen Untersuchungsmaterials, der Art der Präparation und der Färbung, der Erfahrung der Untersucher sowie der Anzahl an wiederholten Ergusseinsendungen der Patienten. Daher ist es ratsam, größere Ergussvolumina oder mehrere Proben einzusenden (Motherby et al., 1999). Laut Sallach et. al. (2002), ist die Sensitivität der Diagnose eines malignen Pleuraergusses jedoch nicht von dem bei der Thorakozentese entnommenen Ergussvolumen abhängig.

Abouzgheib et. al (2009) fanden heraus, dass Proben >50ml die Treffsicherheit der Zytologie nicht weiter erhöhen. So sollten (wenn möglich) etwa 50ml Ergussflüssigkeit nativ eingesendet werden.

Zunächst wird dann das gewonnene Material makroskopisch beurteilt und dokumentiert (Pokieser et al., 2001).

Die klassische zytopathologische Diagnostik an MGG- (May- Grünwald- Giemsa) und PAP- (Papanicolaou) gefärbten Sedimentausstrichen steht nach wie vor an erster Stelle. Die Anfertigung beider Färbungen sollte angestrebt werden, um das gesamte Spektrum von Zellbestandteilen und Strukturen optimal beurteilen zu können. So bietet die MGG-Färbung eine gute Beurteilbarkeit von Zytoplasma, mesenchymaler Grundsubstanz, Zellen des lymphatischen Gewebes, hämatologischen Zellen, Mastzellen sowie der Lagerung der Zellen und Zellverbände zueinander. Mit der Papanicolaou-Färbung lassen sich Zellkerne, verhornende Zellen und Zellen in Detritus sowie Schleim gut beurteilen (Pokieser et al., 2001).

Die angefertigten Präparate werden nun mikroskopisch auf vorkommende Zellen und Strukturen sowie reaktive, metaplastische und degenerative Zellveränderungen hin untersucht.

Zur Vereinheitlichung der Erstellung zytologischer Befunde wurde eine „Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie“ (Böcking, 1998) erarbeitet. Die in dieser Arbeit verwendeten zytologischen Befunde wurden nach diesen Richtlinien erstellt. Hierbei handelt es sich um eine Nomenklatur aus fünf Punkten, die Angaben zum Untersuchungsmaterial, Beschreibung des Untersuchungsmaterials, die Stufung der Malignitätswahrscheinlichkeit, sowie eine Diagnose im Klartext enthalten sollte. Dies ermöglicht einen einheitlichen, auf die wichtigsten Punkte konkretisierten Befund, der der behandelnden Klinik übermittelt wird.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über alle fünf Unterpunkte mit Beispielen.

Tabelle 2 Nomenklatur der deutschen Gesellschaft für Pathologie und Zytologie für die Erstellung von Befunden in der extragenitalen Zytologie (Böcking, 1998)

Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie*
1. Angabe des Untersuchungsmaterials (z.B.: „Pleuraerguss bei Verdacht auf ein metastasierendes Mammakarzinom“).
2. Beschreibung des Untersuchungsmaterials (z.B.: „Übersandt wurden 25ml einer rosafarbenen trüben Flüssigkeit“).
3. Beschreibung der Zellbilder (z.B.: „Massenhaft regressiv veränderte Lymphozyten sowie einzelne und in kleinen Verbänden liegende Mesothelien als auch aktivierte Makrophagen“).
4. Stufung der Malignitätswahrscheinlichkeit Negativ: Bösartige Zellen nicht nachweisbar, Zweifelhaft: Bösartige Zellen nicht sicher auszuschließen, Dringender Verdacht: Bösartige Zellen wahrscheinlich, Positiv: Bösartige Zellen nachweisbar, Unzureichendes Untersuchungsmaterial: mit Begründung (z.B. „da es keine Zellen enthält“).
5. Diagnose im Klartext Möglichst unter Verwendung der ICD-O Klassifikation (z.B.: „Das Zellbild entspricht einer Pleurakarzinose bei Adenokarzinom (ICD-O M8140/6)“). Ggf. Ausschlussdiagnosen, Hinweise, Kommentare, Empfehlungen, Stellungnahme zur klinischen Fragenstellung

1.3.1 Adjuvante Methoden

Neben den klassischen Untersuchungsmethoden an PAP- und MGG- gefärbten Präparaten, bietet die Zytologie eine große Anzahl an adjuvanten Methoden, die dann zum Einsatz kommen, wenn die Diagnose der konventionellen Zytologie unklar ist, oder eine ggfls. bekannte Neoplasie näher typisiert werden soll. Mit ihnen soll die Dignität bestimmt werden bzw. bei bereits positiver Zytologie eine Aussage über die Tumortypisierung in Hinblick auf die Lokalisation und die Art des Primärtumors gemacht werden. Gängige in der Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingesetzte adjuvante Methoden sind

- Immunzytochemie (1.3.1.1)
- Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) (1.3.1.2),
- AgNOR-Analyse (1.3.1.3)
- DNA-Bildzytometrie (1.3.1.4)

Die Immunzytochemie kommt mit Abstand am häufigsten zum Einsatz. Etwa 75% der nach konventioneller Zytologie noch unklaren Fälle können durch den Einsatz adjuvanter Methoden gelöst werden, so dass die Summe der unklaren Fälle, von 9% auf 3% reduziert werden kann (Biesterfeld 2013).

1.3.1.1 Immunzytochemie

Das Grundprinzip der Immunzytochemie beruht auf einer Antigen-Antikörperreaktion, bei der bestimmte Proteine und Peptide durch gegen sie spezifisch gerichtete Antikörperbindung mittels Farbstoffen sichtbar gemacht werden können.

Das zytologische Präparat wird mit einem Antikörper behandelt, welcher an eine bestimmte Gruppe von Antigenen (Epitop) eines Proteinmoleküls bindet. Wenn das Proteinmolekül zwischen verschiedenen Differenzierungsrichtungen einer Zelle unterscheiden lässt, ist der verwendete Antikörper als Marker zur Differenzierung in der Tumordiagnostik geeignet.

Um den Antikörper für die Diagnostik sichtbar zu machen, kommen verschiedene Detektionssysteme zum Einsatz. Hierzu gehören die direkte und indirekte Immunfluoreszenz, bei der der Antikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist bzw. ein markierter zweiter Antikörper eingesetzt wird, der gegen den primären gerichtet ist. Diese Reaktionen werden dann abschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Weitere Detektionsmöglichkeiten bieten die immunenzymatischen Methoden, die ebenfalls wie die indirekte Immunfluoreszenz auf dem Prinzip der Antikörper-Antikörperbindung beruhen.

Die Besonderheit der Immunzytochemie an zytologischen Präparaten ist das im Gegensatz zum histologischen Untersuchungsmaterial oft spärliche Untersuchungsmaterial. Die Zahl der zur Verfügung stehenden Ausstrichpräparate ist meist begrenzt, so dass nur eine eingeschränkte Anzahl an Antikörpern eingesetzt werden kann.

Fehlermöglichkeiten sind schlechte Zellerhaltung oder Präparationsfehler, sie können zu falsch negativen Reaktionen führen. Daher ist es bei der Immunzytochemie oft ratsam, mindestens zwei Antikörper zu verwenden, die alternative Fragen beantworten. Da die Menge an Ergussflüssigkeit häufig begrenzt ist, müssen immunzytologische Methoden genau geplant und gezielt eingesetzt werden, das heißt man benötigt eine eng umschriebene Fragestellung. So ist der vorherige lichtmikroskopische Befund entscheidend für die Auswahl der entsprechenden Antikörperkombinationen (Bubendorf et al., 2010)

Tabelle 3 zeigt Beispiele häufig verwendeter Antikörper/Antikörperkombinationen bei entsprechender Fragestellung in der Ergussdiagnostik der Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Tabelle 3 Häufig in der Cytopathologie der HHU verwendete Marker (Pomjanski et al. 2005)

Fragestellung	Antikörper (Tumormarker)
<i>Epitheliale Zellen im Erguss (praktisch gleichbedeutend mit Malignitätsnachweis)</i>	Ber-EP4/HEA125
<i>Tumortypisierung</i>	
Markerpanel bei unbekanntem Primarius	CK 5/6, CK7, CK20, CA125, TTF1, cdx2
Ovarialtumormarker	CA 125
Mammakarzinommarker	Mammoglobin, GATA-3
Lungentumormarker	TTF-1, Napsin A
Coloncarcinommarker	cdx 2
B-Zell- /T-Zell-Lymphom	CD 20, CD 45Ro

1.3.1.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist eine Methode, die klassische Zytogenetik mit molekularbiologischer Technologie verbindet. Die FISH ist zu einer essentiellen Methode geworden, um Chromosomen und Chromosomensegmente in hoher Auflösung darzustellen. Sie wird eingesetzt in der Grundlagenforschung, v.a. der Tumorgenetik und zur Analyse der Genomorganisation im Zellkern.

Das Grundprinzip der FISH beruht auf der spezifischen Bindung mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter, einzelsträngiger DNA-Sonden an fixierte chromosomale DNA. So können im Fluoreszenzmikroskop die Lokalisierung der Sonde beobachtet werden sowie numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen, wie Polysomien, Translokationen, Deletionen und Genamplifikationen auf Einzelzellniveau nachgewiesen werden (Cajulis et al., 1995; Johnson et al., 1996).

Die FISH ist in der adjuvanten Malignitätsdiagnose nach unklarer Zytologie ebenso wie die DNA-Bildzytometrie einzusetzen. Sie ermöglicht aber bereits eine Tumordiagnose an deutlich weniger atypischen Zellen (etwa 5-6) im Vergleich zur DNA-Bildzytometrie (etwa 300) (Bubendorf et al., 2010). Die Nachteile der FISH sind ein höherer Preis für Sachkosten und ein größerer zeitlicher und personeller Aufwand. Daher kommt in der Cytopathologie der HHU Düsseldorf bei sehr geringer Zahl auffälliger Zellen die teurere

und schwierigere FISH und bei höherer Zahl auffälliger Zellen die DNA-Bildzytometrie zum Einsatz (Biesterfeld 2013). Heute sind verschiedene Sonden mit DNA-Sequenzen der meisten Chromosomen kommerziell erhältlich. Über zu speziellen Genorten passenden Sonden erhält man so Aufschluss über Onkogene und Tumorsuppressorgene.

1.3.1.3 AgNOR-Analyse

Die Abkürzung Ag steht für Argentum (Silber). NOR steht als Abkürzung für nukleäre Organisationsregionen, hierbei handelt es sich um spezifische DNA-Segmente der menschlichen Chromosomen, die für die Synthese ribosomaler RNA verantwortlich sind. Sie stehen als Maß für die ribosomale Biogenese der Zelle. Ihre Menge korreliert mit der Geschwindigkeit des Zellzyklus und der Proliferationsrate der Zelle. Einige der mit NOR-Genen assoziierten Proteine besitzen die Fähigkeit, Silber zu binden. So ist es möglich, NOR in Chromosomenpräparaten und Gewebsschnitten mit einer Färbung mit einer Silberkolloidlösung (1% Ameisensäure, 25% Silbernitrat und Gelatine) indirekt als schwarze Partikel (= AgNOR) nachzuweisen.

Für die Erfassung der Proliferationstendenz von Tumorzellen wird Zahl und Größe der AgNOR, Färbeintensität und die Verteilung der Silberniederschläge herangezogen. Die AgNOR-Analyse ergibt als adjuvante Methode in Zusammenschau mit anderen morphologischen und klinischen Befunden eine weitere prognostische Aussage, so kann mit ihr ferner auch das Risiko eines Tumorrezidivs abgeschätzt werden (Remmele, 1999).

Eine besondere Bedeutung in der Ergussdiagnostik kommt der AgNOR-Analyse in der Abgrenzung zwischen neoplastischen und reaktiven mesothelialen Zellen in der Mesotheliomdiagnostik zu (Pomjanski et al., 2001, Onofre et al., 2008)

1.3.1.4 DNA-Bildzytometrie

DNA-Aneuploidie ist für maligne Tumoren typisch. Sie nimmt während der Entwicklung des Tumors zu und erreicht schließlich ein Ausmaß, das messbar ist. DNA-Aneuploidie bezeichnet formal DNA-Verteilungen, die sich statistisch signifikant von DNA-Verteilungen normaler Zellpopulationen unterscheiden (Haroske et al., 2001). Diese wiederum sind geprägt vom Vorliegen einer ruhenden Zellpopulation in der G_0/G_1 -Phase beim doppelten Chromosomensatz (= $2c$), also einer diploiden DNA-Stammlinie. Diese kann begleitet sein von einer variablen Zahl von Zellen in der S-Phase zwischen $2c$ und $4c$ sowie von einigen Zellen in der G_2/M -Phase im $4c$ -Bereich. Möglich ist an bestimmten Geweben, gerade auch am Mesothel der Pleura, das Auftreten der

euploiden Polyploidisierung, bei der es zum Auftreten von Häufigkeitsgipfeln auch bei 4c, 8c, 16c... kommen kann (Biesterfeld et al., 1994).

Es gibt zwei zytometrische Methoden zur Messung des zellulären DNA-Gehaltes: die Durchflusszytometrie an Aufschwemmungen von Tumorzellen und die Bildzytometrie an Feulgen-gefärbten Zellausstrichen. Die Feulgen-Färbung erlaubt eine entsprechend der Färbeintensität stöchiometrische Messung des DNA-Gehalts (Feulgen, 1924). Bei beiden Methoden wird der gemessene DNA-Gehalt in einem Histogramm gegen die Häufigkeit aufgetragen. Während die Durchflusszytometrie eine automatisierte Messung großer Zellmengen erlaubt, werden bei der DNA-Bildzytometrie unter morphologischer Kontrolle des Untersuchers etwa 300 Analysezellen manuell ausgewählt. Der Untersucher hat hier die Möglichkeit, die relevantesten Zellen zu messen. Insbesondere Einzelzellaneuploidie kann nur mit der DNA-Bildzytometrie detektiert werden. Der Grad der DNA-Aneuploidie korreliert meist mit dem Ausmaß der zytologisch insbesondere in der Pap-Färbung nachweisbaren Kernatypie und mit dem Malignitätsgrad eines Tumors. Ist die DNA-Aneuploidie nur gering, zeigen die Zellen nur geringe morphologische Abweichungen und erscheinen DNA-zytometrisch noch peridiploid wie die meisten nichtneoplastischen Zellen. Tetra- oder oktaploide Zellen besitzen in der Regel vergrößerte aber meist noch wenig atypische Kerne. Tumoren mit Stammlinien außerhalb des di-, tetra-, oder oktaploiden Bereichs sind „aneuploid“ und zeigen meist erhebliche Kernatypien. Besitzen die Tumore mehrere aneuploide Stammlinien, werden sie auch als „multiploid“ bzw. bei Vorliegen diploider und tetraploider Stammlinien als „polyploid“ bezeichnet (Cibas, 1995, Cohen, 1996, Riley et al., 1993).

Die Gründe für DNA-Messungen sind vielfältig. So dienen sie dazu, um lichtmikroskopische Befunde zu objektivieren (Qualitätssicherung), um eine sichere Entscheidungsgrundlage für eine sich anschließende Therapie zu haben und um eine Aussage über die Rezidivneigung eines Tumors zumachen.

Das wichtigste Anwendungsgebiet für die Bildzytometrie ist die Abklärung unklarer zytologischer Befunde, z.B. in der Urinzytologie oder in der Zytologie der Gallenwege, des Pankreas oder der Mundhöhle. Sie ist aber auch in der Ergusszytologie hilfreich, um zwischen Tumorzellen und Mesothelien bzw. Makrophagen mit abnormem Zellkern zu differenzieren (Motherby et al., 1998), (Bubendorf et al., 2010).

1.3.2 Treffsicherheit der Ergusszytologie

In den letzten knapp fünfzig Jahren haben verschiedenste Forschungsgruppen sich mit der Treffsicherheit der Ergusszytologie beschäftigt. Erste Studien wurden schon 1966 von Lopes Cardoso et al. und 1968 von Spriggs und Boddigton durchgeführt. Aktuellere Studien liegen von Oliva-Vasquez et al 1995 und Motherby et al. 1999 vor. Eine größere Studie aus dem Jahr 2008 von Metzgeroth setzt sich mit der Treffsicherheit der Zytologie bei der Untersuchung von Ergüssen seröser Körperhöhlen auseinander.

In Tabelle 4 und 5 auf den folgenden Seiten sind verschiedene Studien aus den Jahren 1966-1985 (Tab. 4) und den Jahren 1990-2008 (Tab. 5) aufgeführt. Die Tabellen enthalten Daten über die Fallzahlen insgesamt, die dann nochmals in maligne und benigne Fälle aufgeschlüsselt wurden. Außerdem wird das Ergebnis der zytologischen Diagnostik (positiv, negativ oder unklar) im Hinblick auf die Dignität der Fälle den im Follow-Up erhobenen Diagnosen gegenüber gestellt und die daraus resultierende Sensitivität und Spezifität der Ergusszytologie ermittelt.

So ergeben sich in den verschiedenen Studien für die Sensitivität der Zytologie Werte zwischen 43% und 71% und für die Spezifität Werte zwischen 91% und 100% (es wurden nur reine Pleuraerguss-Studien berücksichtigt). Errechnet man aus allen in den Tabellen 4 und 5 vorliegenden Pleuraerguss-Studien einen Mittelwert für die Sensitivität und Spezifität, liegt die Sensitivität der Ergusszytologie im Schnitt bei 57,1% und die Spezifität bei 97,1%.

Tabelle 4 Treffsicherheit der Zytologie an Pleuraergüssen. Studien von 1966-1985 (nach Spriggs und Boddington 1989)

	Lopes Cardoso et al. (1966)	Spriggs&Boddington (1968)	Mouriquand et al. (1977)	Martensson et al. (1985)
<i>Fälle gesamt</i>	1248	1746	1039	247
<i>maligne Fälle gesamt</i>	546	640	296	139
zytologisch positive	339	349	200	60
zytologisch negative	178	260	66	63
zytologisch unklare	29	31	30	16
<i>benigne Fälle gesamt</i>	702	1106	743	108
zytologisch positive	2	3	4	0
zytologisch negative	638	1103	732	105
zytologisch unklare	62	0	7	3
Sensitivität	62%	54%	67%	43%
Spezifität	91%	99,7%	98,5%	97%

Tabelle 5 Treffsicherheit der Ergusszytologie. Studien von 1990-2008

	Bueno et al. (1990)	Giazza et al. (1990)	Nance et al. (1991)	Oliva- Vasquez et al. (1995)	Motherby et al. (1999)	Metzgeroth et al.(2008) seröse Ergüsse.
<i>Fälle gesamt</i>	401	200	385	104	291	1234
<i>maligne Fälle gesamt</i>	189	105	109	87	88	619
zytologisch positive	99	63	77	48	44	314
zytologisch negative	90	42	23	39	31	113
zytologisch unklare	0	0	9	0	13	192
<i>benigne Fälle gesamt</i>	212	95	276	17	203	615
zytologisch positive	0	1	0	0	2	50
zytologisch negative	212	94	274	17	197	565
zytologisch unklare	0	0	2	0	4	
Sensitivität	52%	60%	71%	55%	50%	51%
Spezifität	100%	91%	100%	100%	97%	92%

Wie verbessert sich nun die Treffsicherheit der konventionellen Zytologie durch den Einsatz adjuvanter Methoden? Auch hierzu liegen mehrere Studien vor. In diesen kommt meist die Immunzytochemie als adjuvante Methode zum Einsatz. Auch bei der vorliegenden Arbeit wurde klar, dass in der Regel diese Methode bei unklaren Ergüssen zur Anwendung kommt.

Eine Studie an Ergüssen seröser Körperhöhlen (213 pleurale, 85 peritoneale, 7 perikardiale, 8 Lavagen) von Motherby (1999) ergab eine Sensitivität von 53,4% und eine Spezifität von 93,3% für die zytologische Diagnostik. Die Gesamttreffsicherheit bei dieser Arbeit lag bei 78,2%. Zusätzlich wurde untersucht, wie der Einsatz adjuvanter Methoden (Immunzytochemie (BerEP4) und/oder DNA-Zytometrie) diese Ergebnisse beeinflusste. Es zeigte sich eine Verbesserung der Sensitivität von 53,4% auf 61,0%, der Spezifität von 93,3% auf 99,0% und der Gesamttreffsicherheit von 78,2% auf 84,6%.

Schaut man sich die Treffsicherheit bezüglich Malignität verschiedener adjuvanter Methoden in der Ergusszytologie an (Tabelle 6) so liefert die DNA- Bildzytometrie eine Sensitivität von 82,9% und eine Spezifität von 94,7%, die Immunzytochemie eine Sensitivität von 77,8% und eine Spezifität von 100%. Beide Methoden kombiniert zeigen eine Sensitivität von 88,9% und eine Spezifität von 95%. (Motherby, 1999), (Rohn, 2002).

Grefete untersuchte 2008 34 pleurale und peritoneale Ergüsse. Die konventionelle Zytologie zeigte eine Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 73%. Als immunzytochemische Marker setzte Grefete CEA, EMA, HMFG-2 und Calretinin ein, welche zu einer Verbesserung der Sensitivität auf 96% und der Spezifität auf 91% führte (Tabelle 6).

Tabelle 6 Studien von Motherby und Grefete zur Treffsicherheit adjuvanter Methoden im Vergleich zur morphologiebasierten Zytologie (ICC= Immunzytochemie)

	Motherby 1999 (n=219)				Grefete 2008 (n=34)	
	DNA- Zytometrie	ICC (BerEP4)	Kombi. ICC und DNA- Zytometrie	morph Zytologie	morph. Zytologie	ICC (CEA/ EMA/ HMFG-2/ Calretinin)
Sensitivität	82,9	77,8	88,9	53,4	78	96
Spezifität	94,7	100	95	93,3	73	91

Zwei weitere Studien befassten sich mit anderen immunzytochemischen Markernpanelen (Tabelle 7). Metzgeroth kam 2008 an 1234 Ergüssen seröser Körperhöhlen zu dem Ergebnis, dass der Einsatz von HEA125, Panzytokeratin und Calretinin die Sensitivität der morphologiebasierten Zytologie von 51% auf 93% und die Spezifität von 92% auf 100% verbesserte. Eine Studie aus dem Jahre 2013 an 50 pleuralen und peritonealen Ergüssen von Yahya zeigt nach dem Einsatz von Calretinin und CEA einen Anstieg der Sensitivität der morphologiebasierten Zytologie von 77% auf 97% (Tabelle 7).

Tabelle 7 Studien von Metzgeroth und Yahya zeigen die morphologiebasierte Zytologie und der Zugewinn an Treffsicherheit durch die Immunzytochemie (ICC)

	Metzgeroth 2008 (n=1234)		Yahya 2013 (n=50)	
	morph. Zytologie	ICC (HEA125/ Panzytokeratin/ Calretinin)	morph. Zytologie	ICC (CEA/ Calretinin)
Sensitivität	51	93	77	97
Spezifität	92	100	100	100

Andere Studien haben sich mit der Treffsicherheit der Immunzytochemie allein auseinandergesetzt (Tabelle 8). Die Sensitivität der vorliegenden Arbeiten lag

zwischen 66,7% und 76,2%. Die Spezifität zwischen 97% und 100%. Aufgrund der Unterschiede bei der Markerwahl müssen die Studien getrennt voneinander beurteilt werden.

Tabelle 8 Studien von 2001-2013 zur Treffsicherheit der Immunzytochemie alleine

	Ko 2001 (n=53) (CEA/ Calretinin)	Gaspar 2008 (n=155) (CEA, CA15-3, TAG 72)	Trapé 2012 (n=391) (CEA/ CA15-3/ CA19-9)	Hsieh 2013 (n=173) (CEA/ CYFRA 21-1)
Sensitivität	76	75	76,2	66,7
Spezifität	100	100	97	100

1.4 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Treffsicherheit der Zytologie in der Pleuraergussdiagnostik einer zytopathologischen Schwerpunktabteilung zu ermitteln. Es sollten zum einen Sensitivität und Spezifität der konventionellen Ergusszytologie bezüglich einer malignen Ergussursache bestimmt werden, zum anderen aber auch gezeigt werden, welchen etwaigen Zugewinn die Anwendung adjuvanter Methoden für die Tumordetektion sowie für die Tumortypisierung bei positiver Zytologie bringt. Außerdem sollten die ermittelten Ergebnisse mit denen älterer Studien verglichen werden; insbesondere um Aussagen über eventuelle Verbesserungen durch Weiterentwicklungen der zytologischen Untersuchungsmethoden über die Jahre machen zu können bzw. die Ergebnisse anderer Arbeiten kritisch zu betrachten.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkohorte

Gegenstand der Studie waren die zytologischen Diagnosen von Pleuraergüssen, die im Zeitraum von Januar 2010 bis August 2011 in der Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gestellt wurden. Sind für einen Patienten in diesem Zeitraum mehrere Diagnosen an mehreren Einsendungen gestellt worden, so ist für diese Studie nur die Diagnose der ersten Einsendung gewertet worden. Insgesamt wurden in dieser Zeit 2451 Pleuraergüsse von 174 Krankenhäusern und niedergelassenen Ärzten, überwiegend aus NRW, übersandt. Die Kohorte wurde im Weiteren aus Gründen der Durchführbarkeit der Studie auf die zwanzig größten Einsender eingengt, woraus sich zunächst eine Patientenkohorte von 2083 Patienten ergab. Es wurden alle Einsender ausgewählt, die in dem oben genannten Zeitraum mindestens 30 Pleuraergüsse in die Cytopathologie eingesandt hatten. Die entsprechenden zytologischen Routinediagnosen wurden aus der Datenbank DC-Pathos in eine Exceltabelle übertragen. Da es bei drei der Einsender leider nicht möglich war, ein Follow-Up zu erheben, sowie von zwei Patienten lediglich zytologisch unzureichendes Untersuchungsmaterial vorlag, wurde letztlich eine Kohorte von 1726 Patienten von 17 Einsendern zur Auswertung herangezogen. Die Kohorte beinhaltete sowohl zytologisch tumorpositive als auch -negative, zweifelhafte und dringend verdächtige Diagnosen.

In Abbildung 3 sind zunächst alle Ersteinsendungen aus dem Zeitraum Januar 2010 bis August 2011 mit ihrer jeweiligen zytologischen Diagnose aufgeführt. Im weiteren Verlauf zeigt die Abbildung die Größe der Kohorte nach erfolgtem Follow-Up, d.h. die Patienten, von denen bei den jeweiligen Kliniken ein Follow-Up erhoben werden konnte. Auch diese Patienten sind nochmals nach ihren zytologischen Diagnosen unterteilt aufgeführt.

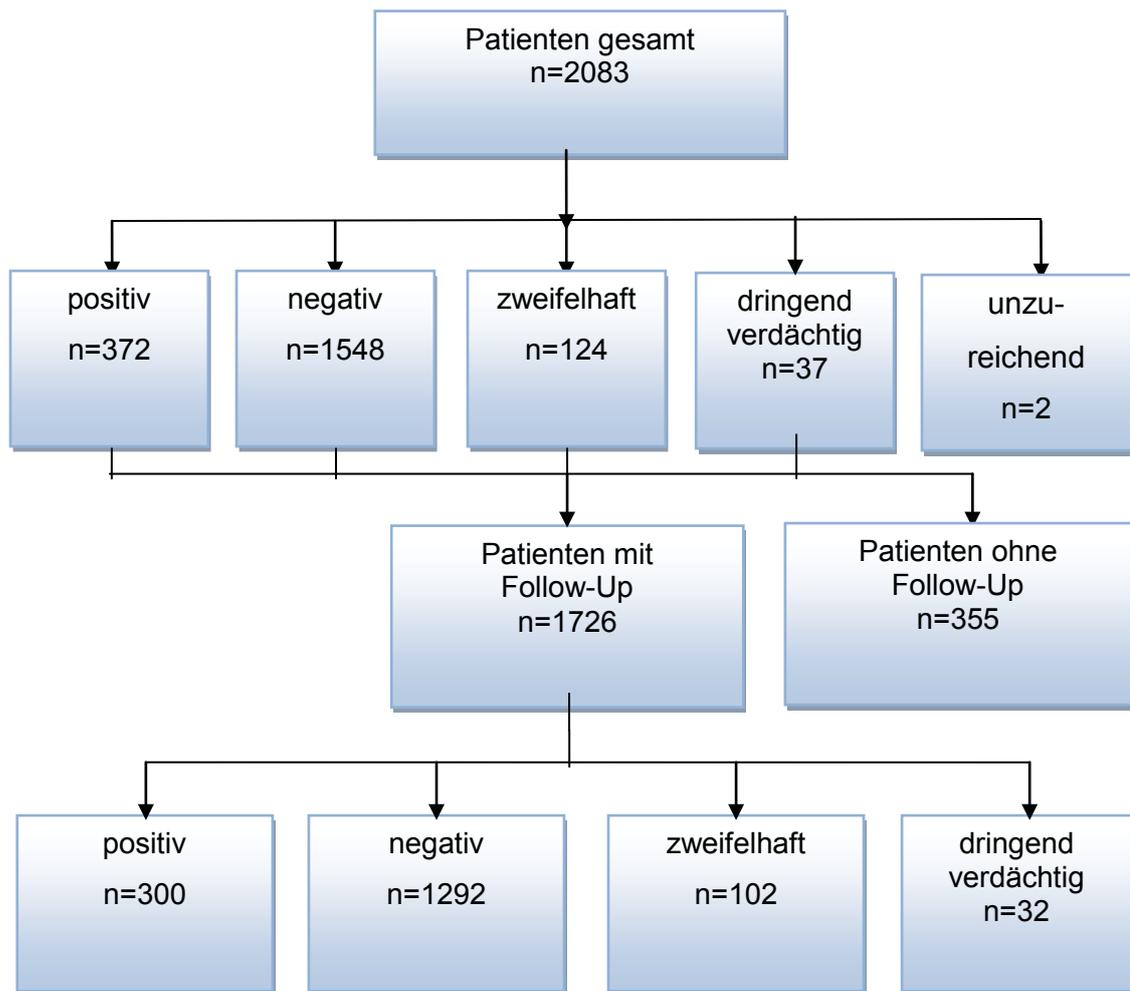


Abbildung 3 Patientenkohorte gesamt und nach Abschluss des Follow-Up

Abbildung 4 auf der folgenden Seite zeigt die Patientenkohorte nach Berücksichtigung des in Kap.2.5 festgelegten Referenzstandards. 138 Patienten fielen heraus, da bei ihnen kein ausreichend langer Follow-Up-Zeitraum vorlag. Hiernach enthielt die Kohorte noch 1588 Patienten mit einem vollständigen Follow-Up. Davon blieben allerdings 151 Fälle unklar, d.h. dass auch nach erfolgtem Follow-Up die Befunde nach Aktenlage keinem positiven oder negativen Referenzstandard zugeordnet werden konnten. So blieben am Ende 1437 Patienten für die Auswertung übrig, die in Abbildung 4 nochmal nach ihrer zytologischen Diagnose unterteilt aufgeführt sind.

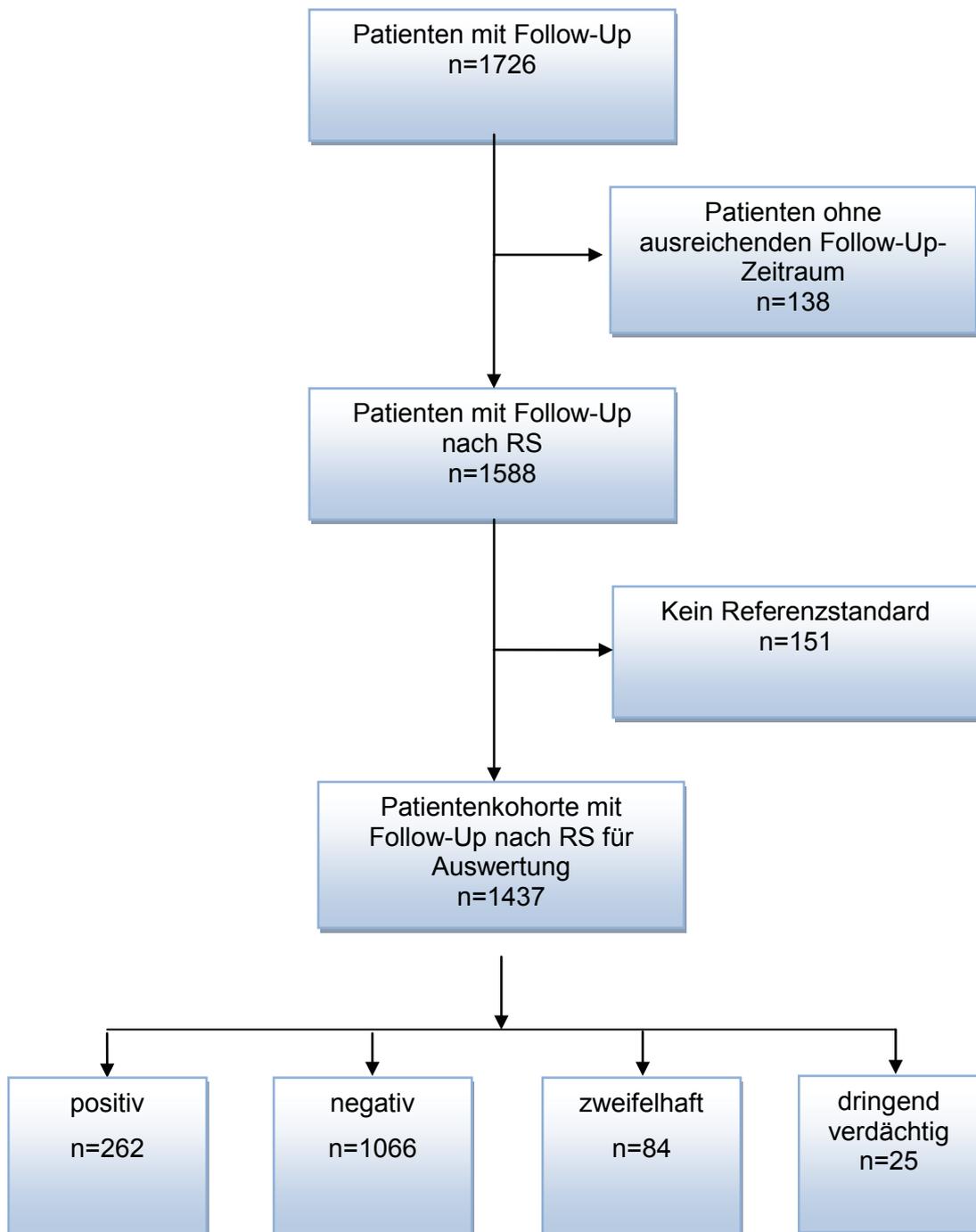


Abbildung 4 Patientenkohorte nach Berücksichtigung des Referenzstandards (RS)

2.2 Ethikvotum

Für diese Arbeit liegt ein positives Ethikvotum mit dem Aktenzeichen #3383 von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vor.

Die Patientendaten wurden zum frühesten praktikablen Zeitpunkt pseudonymisiert. Alle Datensätze wurden stets nur in mehrfach verschlüsselter Form gespeichert. Die Verschlüsselung erfolgte durch das Programm TrueCrypt V7.1.

2.3 Erstellung des Follow-Up Bogens

Für das Follow-Up wurde zunächst das Layout eines Fragebogens erarbeitet. Um die spätere Auswertung zu vereinheitlichen, wurde dieser Fragebogen von Herrn Dipl.-Biol. Ilse vom Schwerpunkt Cytopathologie der HHU mittels *Visual Basic for Applications* (VBA) mit einer Exceltabelle verknüpft. Der Fragebogen wurde so gestaltet, dass die meisten Felder durch Drop-down-Menüs und Kontrollkästchen ausgefüllt werden konnten. Nur wenn es nicht anders möglich war, wurden freie Texteingabefelder verwendet. Der Fragebogen war so gestaltet, dass er bereits bekannte Daten des Patienten aus der Tabelle auslas und dem Benutzer anzeigte. Der Bogen ist in die Hauptfelder Patientendaten, zytologische Abklärung des Pleuraergusses, andere zytologische Untersuchungen, klinisch bekannter maligner Primärtumor, Grunderkrankungen, sowie ein Feld für Anmerkungen, eventuelles Sterbedatum, weiterbehandelnde Einrichtungen und das Datum des letzten Akteneintrags gegliedert. Das Feld der zytologischen Abklärung des Pleuraergusses gibt zum einen die zytologische Diagnose in positiv, negativ, dringend verdächtig und zweifelhaft an sowie die Diagnose im Wortlaut wie z.B. „Das Zellbild entspricht einem Pleuraerguss mit chronisch entzündlicher und hämorrhagischer Komponente“. Außerdem gibt das Feld Auskunft darüber, wo der Ergussort und der Entnahmeort lagen, dies gibt mitunter einen Hinweis über die letztendliche Ursache des Pleuraergusses. Außerdem wurden noch Daten eingetragen über weitere Pleuraerguss-Einsendungen, welche nach der Ersteinsendung erfolgten. Das zweite Hauptfeld beschäftigt sich mit anderen zytologischen Untersuchungsmethoden wie der Bronchiallavage, der Feinnadelaspiration und der Bürstenzytologie, berücksichtigt aber auch die adjuvanten Methoden zur Tumortypisierung und zur weiteren Abklärung der Diagnose, die v.a. bei dringend verdächtigen und zweifelhaften Zytologieergebnissen erfolgte. Hierzu gehören die Immunzytochemie, die FISH, die DNA-Bildzytometrie und die AgNOR-Analyse. Auch von diesen Methoden wurde jeweils die Diagnose, einmal in Kurzform und einmal in ausführlicher Form beschrieben, sowie das Diagnosedatum notiert. Die Daten sowohl über die zytologische Abklärung des Pleuraergusses als auch die für die weiteren zytologischen Methoden lieferte das Datenbankprogramm DC-Pathos.

Im dritten Hauptfeld ging es um Daten über eventuell bekannte maligne Primärtumore. So war es wichtig zu ermitteln, was für eine Art Tumor vorlag (z.B. Lungenkarzinom), sowie wann und mit welchen Methoden die Erstdiagnose gestellt wurde. Zur Vereinfachung wurden hier drei Unterkategorien gewählt, nämlich die Histologie, die Zytologie und bildgebende Verfahren (z.B. CT, Röntgen etc.) sowie Kombinationen aus den dreien. Zusätzlich gibt es Felder für die TNM-Klassifikation des Tumors, Angaben

über Vollständigkeit der Resektion (R-Status), eventuelle Lymphgefäß- oder Veneninvasion, sowie das Grading und den mit den angewandten diagnostischen Methoden erreichbaren Grad an Sicherheit (C-Faktor). Darüber hinaus wurden noch Felder für Metastasen sowie die bisherige bzw. aktuelle Therapie mit Datumsfeld und Felder für einen eventuell vorhandenen Zweittumor hinzugefügt. Am Ende des Feldes enthält der Fragebogen noch die Möglichkeit für Eintragungen zur Histologie des Tumors, z.B. Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, kleinzelliges Karzinom.

Das nächste Hauptfeld führt die Grunderkrankungen auf, die zum Zeitpunkt der Ersteinsendung des Ergusses vorlagen und in Zusammenhang mit der Ergussursache stehen könnten. Zudem gibt es verschiedene Auswahlfelder die Untersuchungen berücksichtigten, die zu einem Tumorausschluss geführt haben. Hier kommt vor allem der Histologie sowie dem CT eine übergeordnete Rolle zu. Zuletzt findet sich noch ein Freitextfeld, in dem aktuelle medikamentöse oder operative Behandlungen aufgeführt wurden.

Das letzte Hauptfeld, das Anmerkungsfeld, ist ein Freitextfeld in dem Besonderheiten aufgeführt wurden, die in dem Fragebogen bisher keine Berücksichtigung fanden. Es wurden wenn vorhanden Aussagen über das Sterbedatum gemacht, um die spätere mittlere Überlebenszeit nach Diagnose einer Pleurakarzinose auszuwerten. Weiterhin wurde das Datum des letzten Follow-Up erfasst, um den Follow-Up-Zeitraum bestimmen zu können.

Der erstellte Fragebogen wurde mit der Patientenliste verknüpft.

Abbildung 5 auf der nächsten Seite zeigt ein zugeschnittenes Bildschirmabbild des Fragebogens

Einsender:

Vorheriger Patient

Nächster Patient

Anmerkungen:

Zytologische Abklärung des Pleuraergusses

Patientendaten	Diagnose	Probenort	Ergussort	weitere zytologische Abklärung der Pleura
Nachname: <input style="width: 100%;" type="text"/>	<input type="checkbox"/> pos <input type="checkbox"/> dV	<input type="checkbox"/> re	<input type="checkbox"/> re	<input type="text"/>
Vorname: <input style="width: 100%;" type="text"/>	<input type="checkbox"/> neg <input type="checkbox"/> zw <input type="checkbox"/> unzur.	<input type="checkbox"/> li	<input type="checkbox"/> li	<input type="text"/>
Geschlecht: <input type="checkbox"/> m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/> u	Tumortypisierung: <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> bds.	<input type="checkbox"/> bds.	<input type="text"/>
Geburtsdatum: <input style="width: 100%;" type="text"/>		<input type="checkbox"/> n.a.	<input type="checkbox"/> n.a.	<input type="text"/>
Eingangsdatum: <input style="width: 100%;" type="text"/>				<input type="text"/>

andere Zytologie

Material 1	<input type="text"/>	Diagnose in Worten 1	<input type="text"/>	Material	<input type="text"/>	Diagnose in Worten 3	<input type="text"/>
Material 2	<input type="text"/>	Diagnose in Worten 2	<input type="text"/>	Material 3	<input type="text"/>	Diagnose in Worten 4	<input type="text"/>

klinisch Bekannt

maligner Primärtumor

Tumorart:

Tumor diagnostik:

Staging: T: N: M:

R: L: V: Gr: C-Fa:

Metastasen

Therapie				
<input type="text"/>				
<input type="text"/>				
<input type="text"/>				
<input type="text"/>				

2. Tumor

Erst diagnose:

Grundkrankung

Diagnose und Tumorausschluss:

CT Endoskopie histol.

Röntgen Sonographie zytol.

Therapie:

Patient verstorben am:

Datum letztes Follow up:

Weiterbehandelte Einrichtungen:

Eingabe OK

Abbildung 5 Zugeschnittenes Bildschirmabbild des zur Nachuntersuchung verwendeten Fragebogens

2.4 Datenerhebung für die klinische Nachuntersuchung (Follow-Up)

Zur Erhebung des Follow-Up wurden sowohl in den Archiven als auch in den digitalen Datenbanken (medico, orbis, SAP) der siebzehn größten Einsender mit Hilfe der vorhandenen Arztbriefe die Patientendaten gesichtet. In den Akten wurde besonderes Augenmerk auf die jeweiligen Arztbriefe, die direkten Bezug zum Datum der Einsendung des Pleuraergusses in die Cytopathologie hatten, sowie auf die Briefe von auf den Erguss folgenden Krankenhausaufenthalten gelegt. Mit diesen Daten wurde dann der oben beschriebene Fragebogen ausgefüllt.

Bei der Sichtung der Arztbriefe galt es insbesondere in Erfahrung zu bringen, was der Grund für den Krankenhausaufenthalt des Patienten zum Zeitpunkt des Pleuraergusses war und ob die Ursache des Ergusses vom Kliniker durch entsprechende Diagnostik und Zusammenschau aller ihm vorliegenden Befunde geklärt werden konnte. Lagen zum Zeitpunkt des Aufenthaltes entsprechende Erkrankungen, die mit dem Pleuraerguss in Verbindung zu bringen waren vor? Wenn ein maligner Primärtumor vorlag: Wurde dieser morphologisch gesichert, d.h. lag eine histologische oder zytologische Untersuchung vor; wurden Aussagen über die TMN-Klassifikation gemacht bzw. hat eine Therapie des Tumors stattgefunden oder war eine entsprechende Behandlung geplant? Die Daten zur Tumortherapie waren zur Absicherung besonders nach positiver Zytologie wichtig, um zu ermitteln, wie der Kliniker auf das zytologische Ergebnis reagiert hatte.

Wenn keine Tumorerkrankung Grund für den Klinikaufenthalt war, musste nach entsprechenden Grunderkrankungen, Operationen oder Traumata gesucht werden, die dem Pleuraerguss zu Grunde liegen konnten. Außerdem wurden Befunde aus verschiedenen bildgebenden Verfahren, speziell aus CT, Sonographie und dem Röntgen dahingehend gesichtet, ob hier Zeichen einer Entzündung oder einer Raumforderung vorlagen, oder ob ein malignes Geschehen verifiziert oder in Zusammenschau mit den anderen Befunden ausgeschlossen werden konnte.

Danach wurden Daten darüber erhoben, wie der Patient zum Zeitpunkt des Pleuraergusses behandelt wurde.

Zuletzt wurde noch das Datum des letzten Follow-Up ermittelt, welches mit dem Datum des letzten vorliegenden Arztbriefs gleichgesetzt wurde. Außerdem wurde eventuell das Versterben des Patienten erfasst.

Anhand der Follow-Up Daten wurde ermittelt, ob die Patienten letztlich eine maligne Ursache des Pleuraergusses hatten, oder nicht. Kriterien für diesen positiven oder

negativen Referenzstandard wurden vorab definiert (siehe Kapitel 2.5) und die zytologischen Diagnosen mit diesem Referenzstandard verglichen.

2.5 Definition eines Referenzstandards für eine maligne Ergussursache

Es folgen die Definitionen der Positivkriterien (Kap. 2.5.1) und der Negativkriterien (Kap. 2.5.2) für den Referenzstandard. Alle Fälle, die weder die Positivkriterien noch die Negativkriterien eindeutig erfüllten, werden als unklare Fälle bei der folgenden statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

2.5.1 Positivkriterien des Referenzstandards

Ein Patient erfüllt die Positivkriterien des Referenzstandards, wenn in der Anamnese ein maligner Tumor bekannt ist und keine andere häufig mit einem Pleuraerguss assoziierte Grunderkrankung vorliegt, die den Pleuraerguss verursacht haben könnte. Eine maligne Grunderkrankung wird dann angenommen, wenn ein maligner Tumor durch zytologische oder histologische Untersuchung gesichert worden ist oder wenn der Patient anamnestisch auf ein malignes Tumorleiden behandelt worden ist. So sind zum Beispiel operative onkologische Eingriffe, Chemotherapien, Strahlentherapien als klinische Tumorbehandlung zu werten.

Ist bei einem Patienten ein maligner Tumor bekannt und leidet er gleichzeitig unter einer Erkrankung, die für den Pleuraerguss als Ursache in Frage kommt, wird nur dann eine maligne Ergussursache angenommen, wenn durch weitere klinische Daten, insbesondere durch ein oder mehrere bildgebende Verfahren, die maligne Natur des Ergusses naheliegt.

Entsprechende Fälle, die sich entsprechend der oben genannten Kriterien nicht eindeutig zuordnen lassen, d.h. wo sowohl ein maligner Tumor als auch eine benigne Grunderkrankung für den Pleuraerguss verantwortlich sein konnten, wurden als unklare Fälle bei der späteren statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

2.5.2 Negativkriterien des Referenzstandards

Eine nicht maligne Ergussursache wird dann angenommen, wenn kein maligner Tumor (Def. s. Positivkriterien des Referenzstandards) vorliegt. Außerdem muss anamnestisch eine dem Pleuraerguss zu Grunde liegende benigne Grunderkrankung, eine Operation oder ein Trauma bekannt sein, welche in zeitlichem Zusammenhang

mit dem Auftreten des Pleuraergusses steht und somit als Ergussursache in Frage kommen könnte. Als weiterer Punkt muss ein Follow-Up Zeitraum nach dem initialen Erguss von mindestens zwei Monaten erfüllt sein, indem keine Pleurakarzinose aufgetreten ist.

Liegt bei Patienten mit für den Pleuraerguss als Ursache in Frage kommender benigner Grunderkrankung zusätzlich noch ein maligner Tumor vor, erfüllt der Patient nur dann die Negativkriterien des Referenzstandards, wenn neben der Grunderkrankung weitere klinische Daten (v.a. ein bildgebendes Verfahren) vorliegen, die beim Kliniker zum Ausschluss einer Pleurakarzinose geführt haben. Des Weiteren sind die Negativkriterien des Referenzstandards erfüllt, wenn eine Pleurakarzinose auf Grund der Tumorart (z.B. Basaliom) oder durch entsprechende TNM-Klassifikation des Tumors in Zusammenschau mit der Tumorlokalisation unwahrscheinlich ist. Natürlich ist auch hier nur in Zusammenhang mit entsprechender für den Pleuraerguss ursächlicher benigner Grunderkrankung ein negativer Referenzstandard erfüllt.

2.6 Adjuvante Methoden zur Tumortypisierung

Die Durchführung der unten genannten adjuvanten Methoden als Bestandteil der Routinezytologie lag in den Händen der diagnostizierenden Pathologen. Für die vorliegende Doktorarbeit wurden aber die Diagnosen verwendet und dem Follow-Up gegenübergestellt. Trotzdem werden die adjuvanten Methoden im Folgenden (ab Kap. 2.6.2) kurz beschrieben.

2.6.1 Definition der Kohorte für die Tumortypisierung

Um die Treffsicherheit der in der zytologischen Routinediagnostik angewandten adjuvanten Methoden (s.u.) in Bezug auf die korrekte histogenetische Tumortypisierung auswerten zu können, wurden ebenfalls die Follow-Up Daten entsprechend dem in Kap. 2.5.1 definierten positiven Referenzstandard herangezogen. Zur Kohorte für die Tumortypisierung gehörten alle Patienten, bei denen im Anschluss an eine positive zytologische Diagnose mindestens eine adjuvante Methode zur Tumortypisierung angewendet wurde. Patienten, die im Follow-Up als unklar klassifiziert wurden und alle Patienten mit positiver Zytologie alleine ohne adjuvante Methode werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Zytologisch ist ein Tumor dann korrekt typisiert, wenn er mit der Follow-Up Diagnose übereinstimmt, bzw. im zytologischen Befund als Differentialdiagnose angeboten wird.

2.6.2 Durchführung adjuvanter Methoden am Schwerpunkt Cytopathologie der HHU Düsseldorf

Die in die Zytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingesandte Ergussflüssigkeit wird zunächst Zellanreicherungsverfahren wie der konventionellen Zentrifugation oder der Zytozentrifugation unterzogen (5 min bei 500 xg). Der Überstand wird dekantiert und je 1 Tropfen des in der Restflüssigkeit aufgeschüttelten Sediments zwischen zwei Objektträgern ausgestrichen. Insgesamt werden so 6 Präparate hergestellt, wovon 3 luftgetrocknet und nach MGG, sowie 3 alkoholisch fixiert und nach Papanicolaou gefärbt werden. Eventuell geronnenes Untersuchungsmaterial oder vorhandenen Gewebeanteile werden in 4 ml 10% Formalin gegeben, wie Gewebe entsprechend im Institut für Pathologie aufgearbeitet, ein Zellblockpräparat erstellt und ein 5 Mikrometer dicker Schnitt mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt.

2.6.3 Immunzytochemie

Die fixierten und nach Papanicolaou gefärbten Präparate eignen sich besonders nach erfolgter Basiszytologie für die Immunzytochemie.

Dabei wird ein Brückenantikörper mit einem gegen ein Zellantigen gerichteten Antikörper verbunden. Nach der Zugabe eines Substrats entsteht schließlich ein Farbstoff, der die Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar macht.

In der zytologischen Diagnostik haben sich die PAP-Methode (Peroxidase-Anti-Peroxidase-Komplex), die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) sowie die APAAP-Methode (alkalische Phosphatase-Antialkalische Phosphatase-Komplex) durchgesetzt (Bubendorf et al., 2010).

In der Abteilung für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wird die ABC-Methode verwendet. Bei dieser macht man sich die hohe Affinität des Glykoproteins Avidin für das wasserlösliche Vitamin Biotin zunutze. Es wird über einen biotinylierten Antikörper ein vorgefertigter Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex an ein gewebegebundenes Antigen fixiert. Die Peroxidase kann anschließend mittels einer Färbereaktion nachgewiesen werden (Remmele 1999).

In den zytologischen Präparaten sind die Zellen weitestgehend intakt, was den Zugang des Antikörpers in die Zelle erschweren kann. Daher müssen Vortests erfolgen, die prüfen, bei welcher Antikörperkonzentration und unter welchen Inkubationsbedingungen eine Reaktion möglich ist. Des Weiteren muss das

Zellmaterial sehr dünn ausgestrichen sein, da sonst das Ablesen der immunzytochemischen Reaktion durch Überlagerung von anderen Zellen erschwert ist. Auch der Klinik kommt eine wichtige Rolle zu, so hängen die Qualität der Proben und das spätere immunzytochemische Ergebnis in großem Maße von der richtigen Entnahmetechnik ab. Daher ist es wichtig, dass die Einsender über gute Anleitungen zur Materialgewinnung verfügen (Bubendorf et al., 2010). Alle immunzytochemischen Anwendungen erfolgen gemäß den *Standard Operating Procedures* (SOP) der Abteilung.

Tabelle 9 auf der folgenden Seite zeigt in der Cytopathologie der HHU Düsseldorf eingesetzte immunzytologische Marker (Antikörper), deren Verdünnung, Hersteller und Bestellnummer.

Tabelle 9 Liste der eingesetzten Antikörper

Antikörper	Klone		Verdünnung	Hersteller	Bestell-Nummer
Ber-EP4 (Anti-Human-Epithelial Antigen)	Ber-EP4	monoclonal mouse	1:200	Dako Denmark, Produktionvej 42 DK-260 Glostrup Dänemark	M 0804
Ep-CAM (Human Epithelium Antigen)	HEA 125	monoclonal mouse	1:200	PROGEN Biotechnik GmbH Maaßstrasse 30 69123 Heidelberg	61004
Calretinin (Anti Human Calretinin)	DAK Calret 1	monoclonal mouse	1:200	Dako Denmark, Produktionvej 42 DK-260 Glostrup Dänemark	M 7245
EMA (Epitheliales Membran Antigen)	E 29	monoclonal mouse	1:1600	Dako Denmark, Produktionvej 42 DK-260 Glostrup Dänemark	M 0613
WT1 (Wilms' Tumor Protein 1)	6F-H2	monoclonal mouse	1:200	DCS Diagnostik Systeme Poppenbüttler Chaussee 36 22397 Hamburg	WI865C
Desmin (Anti Human Desmin)	D33	monoclonal mouse	1:200	Dako Denmark, Produktionvej 42 DK-260 Glostrup Dänemark	M 0760
CD 68 (Anti Human CD 68)	PG-M1	monoclonal mouse	1:200	Dako Denmark, Produktionvej 42 DK-260 Glostrup Dänemark	M 0876
CD 20 (Anti Human CD 20cy)	L 26	monoclonal mouse	1:400	Dako Denmark, Produktionvej 42 DK-260 Glostrup Dänemark	M 0755
CD 79 a (Anti Human CD 79a)	JCB 117	monoclonal mouse	1:100	Dako Denmark, Produktionvej 42 DK-260 Glostrup Dänemark	M 7050
CD 45 R0 (Anti Human CD 45 R0)	UGHL 1	monoclonal mouse	1:400	Dako Denmark, Produktionvej 42 DK-260 Glostrup Dänemark	M 0742

2.6.4 Weitere adjuvante Methoden

In jeweils nur zwei Fällen kamen noch die DNA-Bildzytometrie und die AgNOR-Analyse zum Einsatz. Aufgrund der geringen Fallzahl wird hier auf eine detaillierte Beschreibung der Verfahren verzichtet und auf die SOPs des Schwerpunktes Cytopathologie verwiesen.

2.7 Statistische Auswertung

Bei der deskriptiven statistischen Auswertung werden die zytologischen Untersuchungsergebnisse mit dem Referenzstandard abgeglichen, um Aussagen über Sensitivität, Spezifität, positiven prädiktiven Wert, negativen prädiktiven Wert sowie Gesamttrefferbarkeit der zytologischen Untersuchung treffen zu können. Im Weiteren wird ermittelt, wie genau die Tumortypisierung mit Hilfe der adjuvanten Methoden ist und in wie weit adjuvante Methoden die Trefferbarkeit der zytologischen Untersuchungsmethoden erhöhen können.

2.7.1 Vierfeldertafel

Grundlage zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität ist die Aufstellung einer Vierfeldertafel (Gerok, 2007) (Tabelle 10), mit dessen Hilfe sich beide Werte später über die weiter unten beschriebenen Formeln errechnen lassen.

Tabelle 10 Die Vierfeldertafel als Grundlage zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität (Baenkler und Fritze, 1999)

	Krank	nicht krank		
Testergebnis	positiv	richtig positiv(rp)	falsch positiv(fp)	alle positiven rp + fp
	negativ	falsch negativ(fn)	richtig negativ(rn)	alle negativen fn + rn
	alle Kranken rp + fn	alle Nichtkranken fp + rn	alle Patienten	

So ergeben sich folgende Begriffe (Baenkler und Fritze, 1999):

2.7.2 Sensitivität

Die Sensitivität und die Spezifität sind Kennzahlen der Qualität eines Tests (Trappl und Trost, 2010). Die **Sensitivität** eines Tests für eine Erkrankung bezeichnet den Anteil aller von dieser Krankheit betroffenen Personen, bei denen der Test ein positives (pathologisches) Ergebnis geliefert hat.

$$\text{Sensitivität} = \frac{rp}{rp+fn} \times 100 = \frac{\text{richtig positiv}}{\text{alle Kranken}} (\%)$$

2.7.3 Spezifität

Die **Spezifität** eines Tests ergibt sich aus dem Anteil aller tatsächlich Gesunden, bei denen der Test ein negatives Ergebnis geliefert hat.

$$\text{Spezifität} = \frac{rn}{rn+fp} \times 100 = \frac{\text{richtig negativ}}{\text{alle Nichtkranken}} (\%)$$

2.7.4 Positiver und negativer prädiktiver Wert

Der positive prädiktive Wert (PPW) beschreibt den Prozentsatz von Krankheitsdiagnosen, die sich später als korrekt herausstellen.

$$\text{PPW} = \frac{rp}{rp+fp} \times 100 = \frac{\text{richtig positiv erkannt}}{\text{positiv erkannt}} (\%)$$

Der negative prädiktive Wert (NPW) ist der Prozentsatz von zu Recht als gesund diagnostizierten Befunden.

$$\text{NPW} = \frac{rn}{rn+fn} \times 100 = \frac{\text{richtig negativ erkannt}}{\text{negativ erkannt}} (\%)$$

2.7.5 Die Gesamttreffsicherheit (GT)

Die Gesamttreffsicherheit gibt den Prozentsatz aller richtig klassifizierten Fälle an (richtig positive und richtig negative Diagnosen).

$$GT (\text{richtig klassifiziert}) = \frac{rp+rn}{rp+fp+rn+fn} \times 100 = \frac{\text{richtig klassifiziert}}{\text{alle Fälle}} (\%)$$

2.7.6 Ziele der statistischen Auswertung

Es sollten zunächst die Spezifität und die Sensitivität der Zytologie an Pleuraergüssen alleine, d.h. ohne adjuvante Methoden, mit Hilfe der Vierfeldertafeln ermittelt werden, um so eine Aussage über die Qualität der rein morphologiebasierten Zytologie (Basiszytologie) in der Ergussdiagnostik an Pleuraergüssen machen zu können.

Da die Basiszytologie nicht nur zwei (negativ, positiv), sondern vier Kategorien (negativ, zweifelhaft, dringender Verdacht, positiv) kennt, wurden verschiedene Auswertungsvarianten gewählt.

1. Die zytologisch dringend verdächtigen und zweifelhaften Fälle wurden als testpositiv gewertet.
2. Die zytologisch dringend verdächtigen und zweifelhaften Fälle wurden als testnegativ gewertet.
3. Die zytologisch dringend verdächtigen Fälle wurden als testpositiv, die zweifelhaften Fälle als testnegativ gewertet.

Außerdem sollte ermittelt werden, welchen Zugewinn an Treffsicherheit der Einsatz adjuvanter Methoden zusätzlich zur Basiszytologie erbringt bzw. wie viele der nach Basiszytologie unklaren Fälle aufgeklärt werden konnten. Dabei wurden alle angewandten adjuvanten Methoden (Immunzytochemie, DNA- Bildzytometrie, AgNOR) als Einheit betrachtet und als abschließende zytologische Diagnose zusammengefasst, um eine verwertbare Aussage zu erhalten. Des Weiteren wird die Treffsicherheit adjuvanter zytologischer Methoden bei der Tumortypisierung ausgewertet.

Es erfolgen Aussagen über die prozentuale Verteilung der Pleuraergüsse nach zytologischer Diagnose, sowie zur geschlechtsspezifischen Verteilung der Ergüsse. Es werden darüber hinaus die Altersverteilung der Patienten sowie die häufigsten Lokalisationen der Ergüsse dargestellt und Aussagen über die Lokalisation des Primarius bei vorhandener Pleurakarzinose gemacht.

3 Ergebnisse

3.1 Befunde nach Follow-Up und Berücksichtigung des Referenzstandards

Nach der Auswertung des Follow-Up mit Hilfe der in Kapitel 2.5 festgelegten Kriterien für den Referenzstandard waren 33,6% (n=533) der Patienten tumorpositiv und 56,9% (n=904) tumornegativ. Die Restlichen 9,5% (n=151) der Patienten konnten keinem positiven oder negativen Referenzstandard zugeordnet werden und wurden daher aus der Studie ausgeschlossen (Abbildung 6).

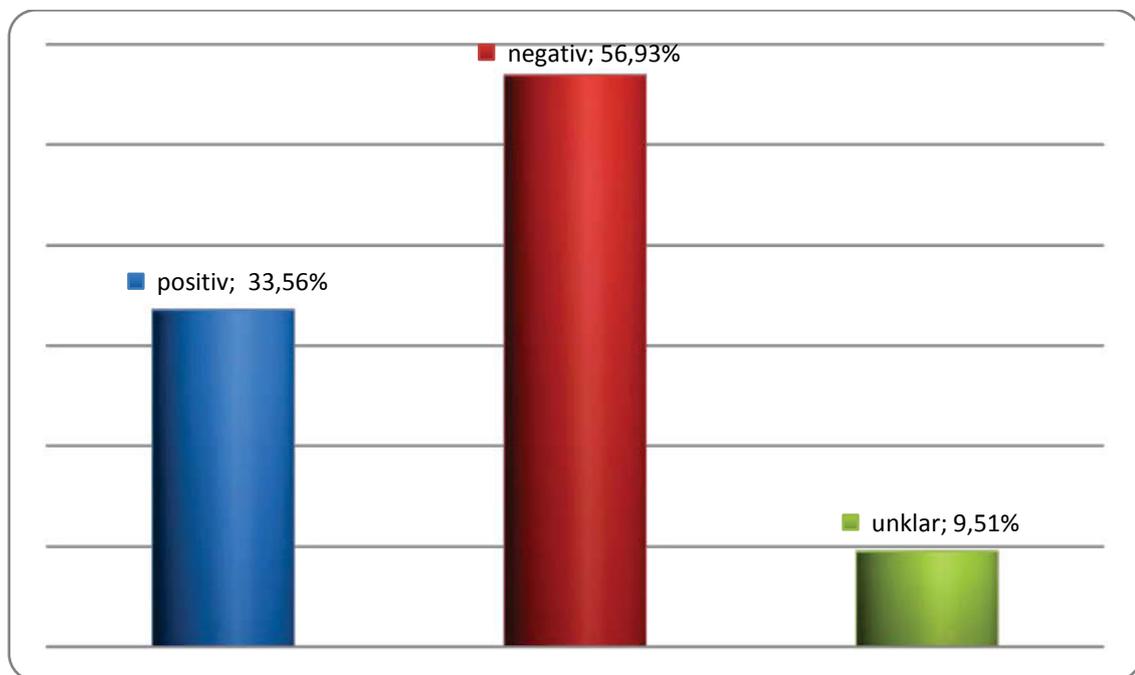


Abbildung 6 Patientenkohorte nach klinischem Follow-Up mit Referenzstandard in %

Werden die unklaren Patienten nicht berücksichtigt, das heißt legt man die 1437 Patienten zugrunde, die ein klares Follow-Up besaßen, so erfüllten 37,1% den positiven und 62,9% den negativen Referenzstandard.

Schaut man sich nur die zytologischen Diagnosen nach Sichtung der 1437 Patienten an, die den Referenzstandard erfüllten erhält man folgendes Ergebnis. 18,2% (n=262) zytologisch positive, 74,2% (n=1066) negative, 5,9% (n=84) zweifelhafte und 1,7% (n=25) dringend verdächtige Fälle (Abbildung 7).

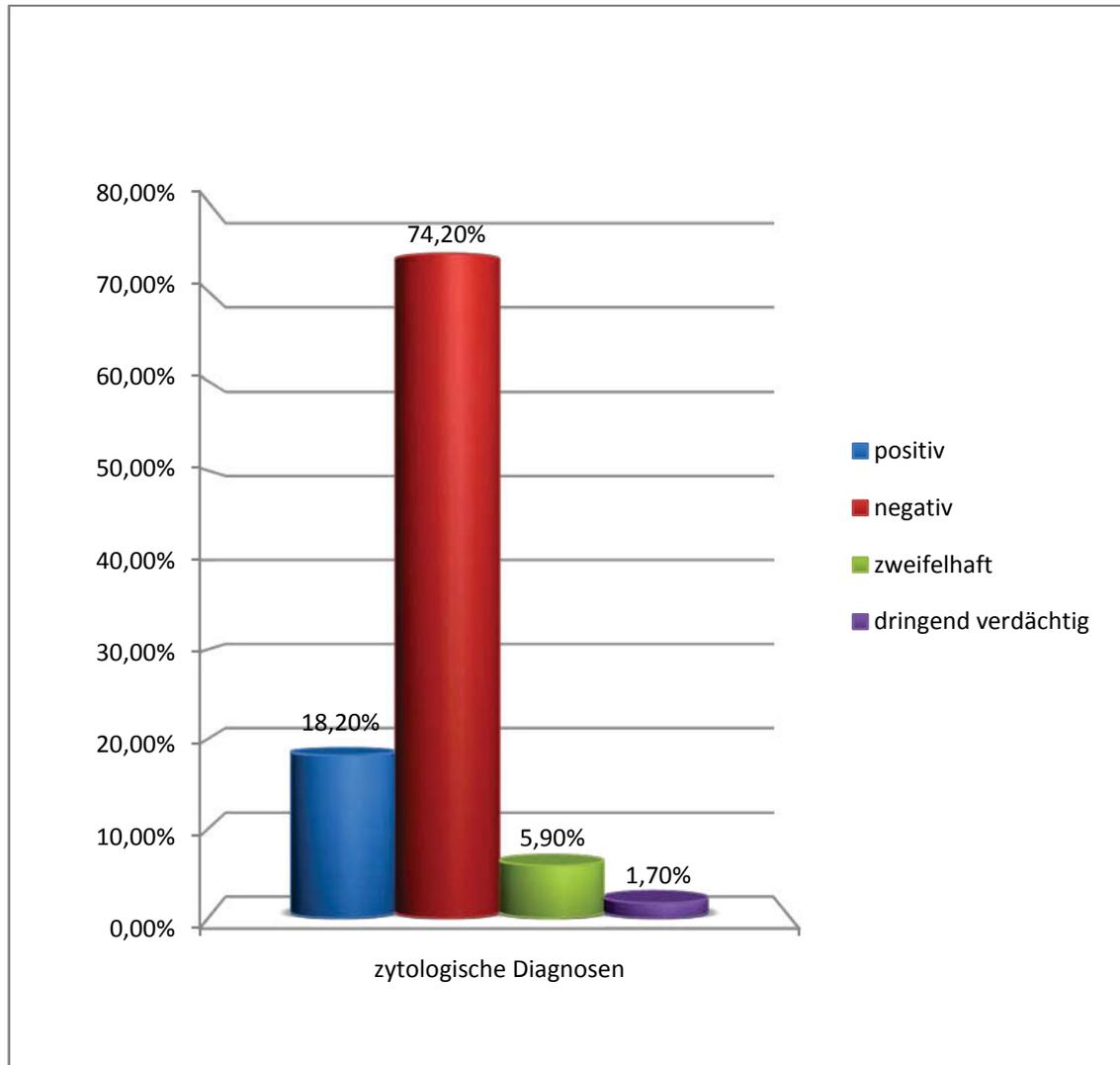


Abbildung 7 Prozentuale Verteilung der zytologischen Diagnosen an Hand der Patientenkohorte nach Follow-Up und Berücksichtigung der Ausschlusskriterien des Referenzstandards

Die Auswertung der Pleuraergüsse nach Geschlecht (Abbildung 8) zeigt, dass im Untersuchungszeitraum die männlichen Patienten mit 54,3% (n= 780) häufiger einen Pleuraerguss als die weiblichen mit 45,7% (n= 657) entwickelten.

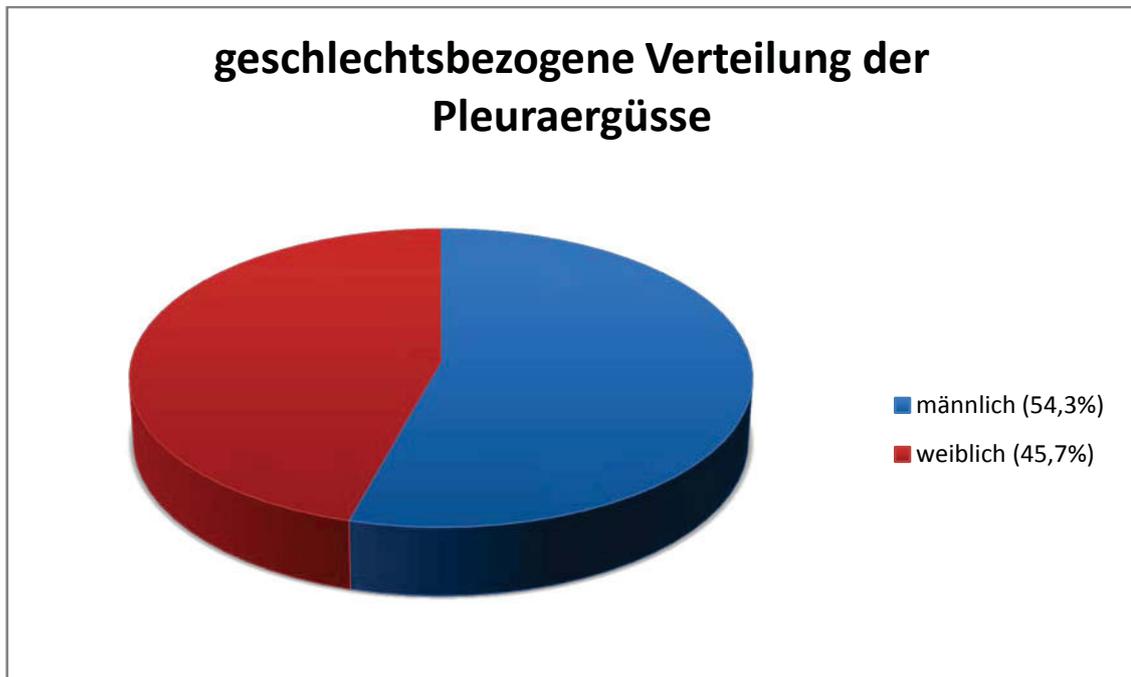


Abbildung 8 Geschlechtsspezifische Verteilung der Pleuraergüsse laut Follow-Up

Betrachtet man nur die zytologischen Befunde alleine ohne klinische Diagnosen oder andere pathologische Befunde und schlüsselt man nun die geschlechtsspezifische Verteilung getrennt in positive, negative, dringend verdächtige und zweifelhafte zytologische Diagnose auf, zeigt sich, dass Frauen zwar seltener einen Pleuraerguss entwickelten als Männer, bei ihnen aber deutlich häufiger (Frauen 23,4%, Männer 13,9%) eine positive zytologische Diagnose gestellt wurde. Das bedeutet wiederum, dass bei fast $\frac{1}{4}$ der Pleuraergüsse bei Frauen zytologisch die Diagnose einer Pleurakarzinose gestellt wurde. Bei Männern enthielt demgegenüber nur in etwa jeder siebte Erguss maligne Zellen.

Mit 79,2% bei Männern und 68,2% bei Frauen wurde der Großteil der Ergüsse jedoch als negativ befundet.

Seltener wurden die Diagnosen zweifelhaft (Männer 5,5%, Frauen 6,2%) und dringend verdächtig (Männer 1,4%, Frauen 2,1%) gestellt, bei denen sich an die allgemeine Zytologie bei ausreichender Anzahl der suspekten Zellen im Untersuchungsmaterial in der Regel noch eine adjuvante Methode anschloss.

In Abbildung 9 wird die Verteilung der zytologischen Diagnosen nach Geschlechtern getrennt nochmals verdeutlicht.

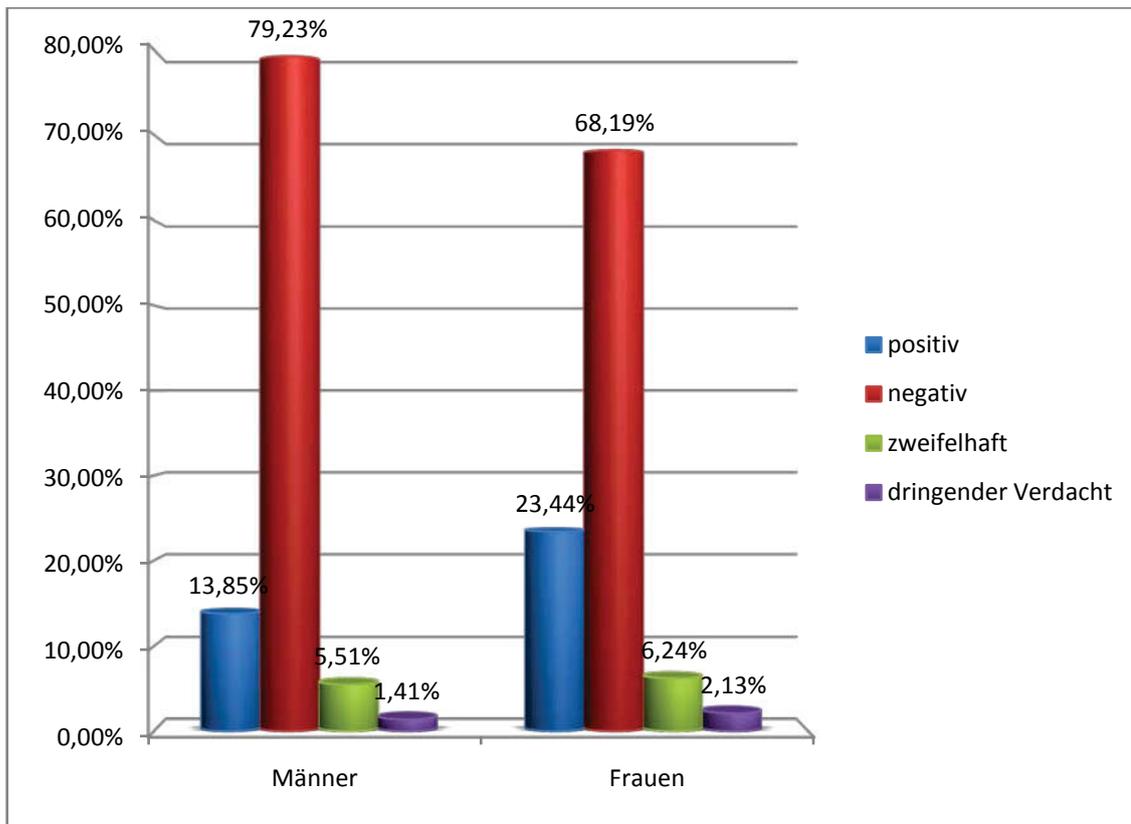


Abbildung 9 Verteilung der Pleuraergüsse nach zytologischer Diagnose in %

3.2 Geschlechtsspezifische Verteilung der Ergussursachen laut Follow-Up

277 (42,2%) der Patientinnen entwickelten laut Follow-Up einen malignen und 380 (57,8%) der Patientinnen einen gutartigen Pleuraerguss. Bei den männlichen Patienten entwickelten 256 (32,8%) einen malignen und 524 (67,2%) einen gutartigen Erguss. Das bedeutet, wie die zytologischen Ergebnisse oben schon zeigten, dass obwohl Männer häufiger einen Pleuraerguss entwickelten als Frauen (m=780(54,3%)/w=657(45,7%)), die weiblichen Patienten aber prozentual häufiger, d.h. in 42,2% der Fälle an einer Pleurakarzinose erkrankten. Im Gegensatz dazu sind bei Männern die Ergüsse „nur“ in 32,8% der Fälle maligne. Dem gegenüber sind somit 57,8% der Pleuraergüsse bei Frauen und 67,2% der Ergüsse bei Männern gutartig.

Abbildung 10 zeigt die Verteilung der Pleuraergüsse gemäß Follow-Up in maligne und benigne Ergüsse getrennt nach Männern und Frauen.

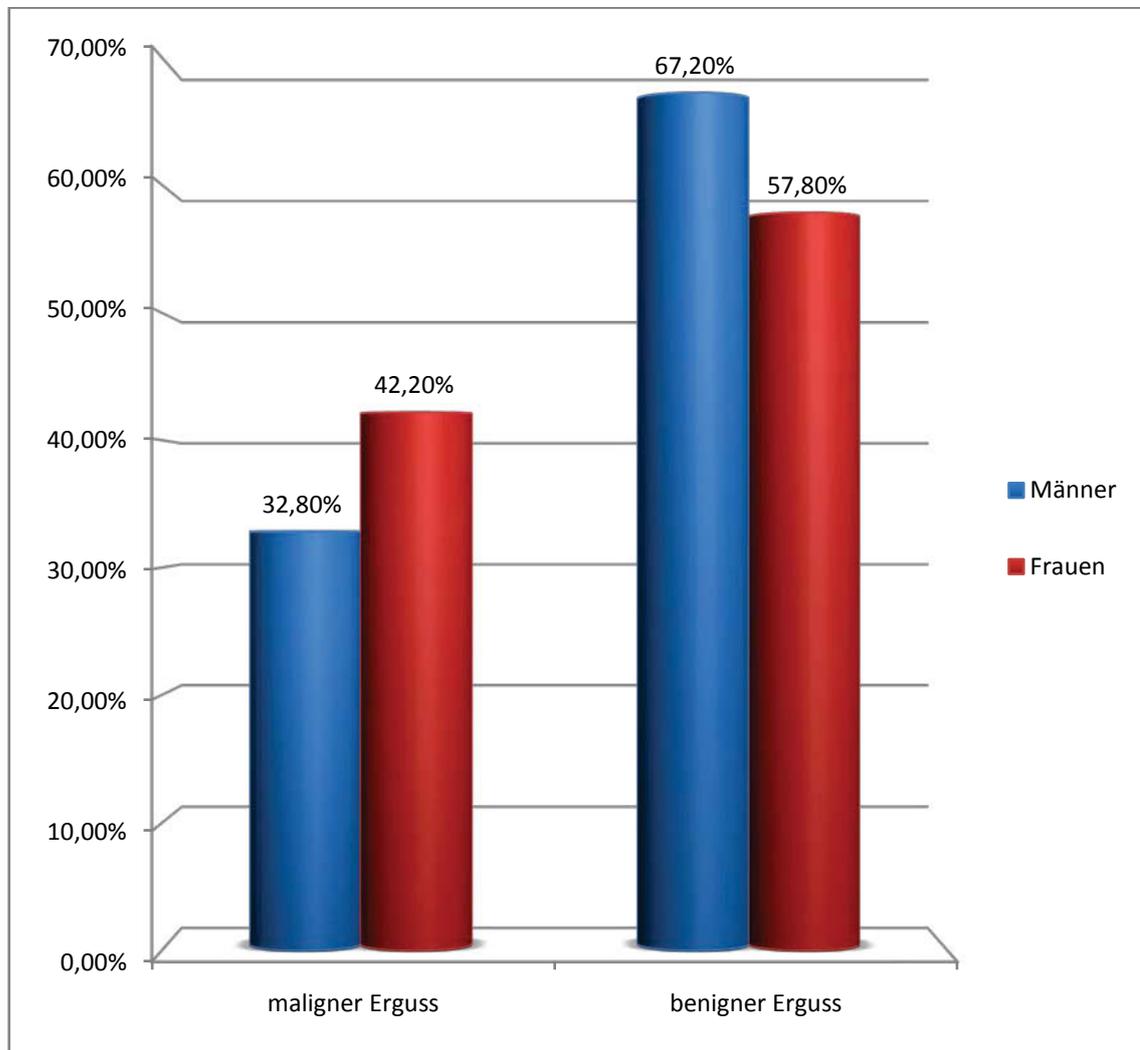


Abbildung 10 Geschlechtsspezifische Verteilung der Pleuraergüsse (maligne u. benigne) in %

So verteilen sich die malignen Ergüsse wie folgt: 48% auf Männer und 52% auf Frauen. Die gutartigen verteilen sich zu 42% auf Frauen und 58% auf Männer.

3.3 Lokalisation der Pleuraergüsse

Bei 1291 Patienten mit zytologisch positiven oder negativen Diagnosen wurde in den Arztbriefen bzw. auf den Einsendescheinen eine Aussage über die Lokalisation des Pleuraergusses gemacht, d.h. befand sich der Erguss klinisch links, rechts oder beidseits. Mit 42% (n=542) kommen am häufigsten beidseitige Ergüsse vor, gefolgt von auf der rechten Seite lokalisierten mit 32,9% (n=425) und linksseitigen Ergüssen mit 25,1% (n=324).

Abbildung 11 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Lokalisation der Pleuraergüsse aus der vorliegenden Patientenkohorte.

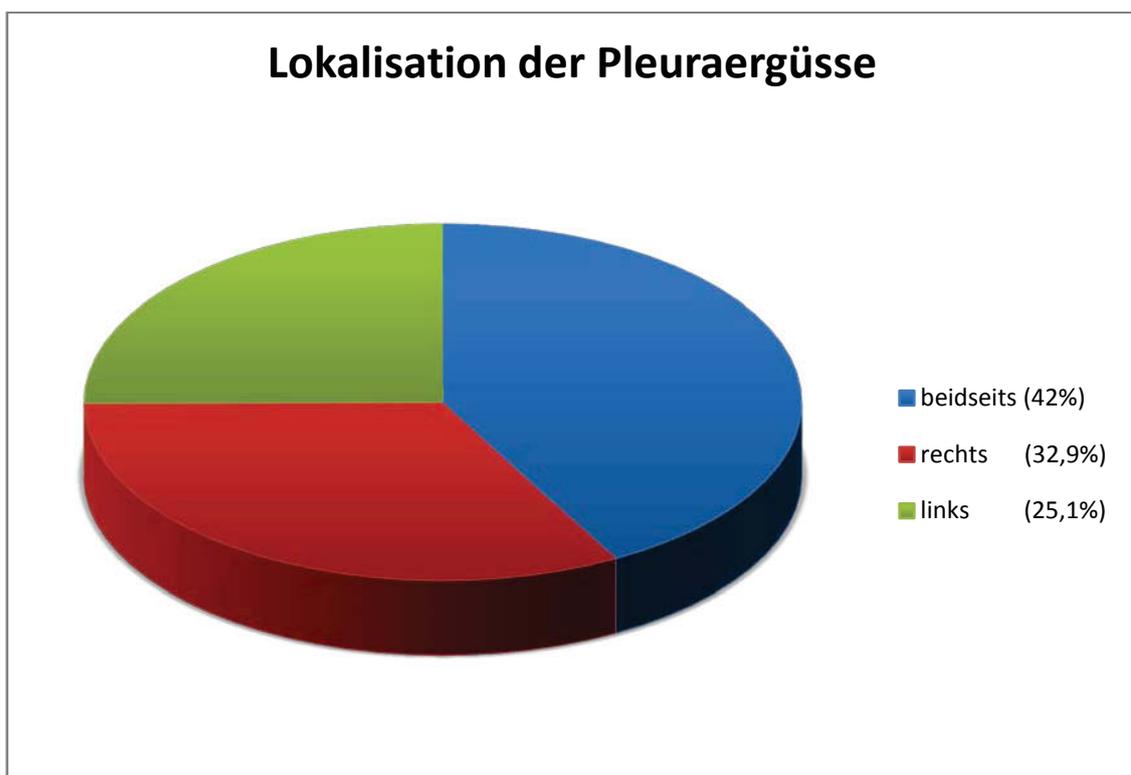


Abbildung 11 Häufigkeitsverteilung der Pleuraergüsse insgesamt nach Lokalisation (Angaben der Klinik)

In Abbildung 12 auf der folgenden Seite sind die drei verschiedenen Lokalisationen der Pleuraergüsse getrennt voneinander mit den jeweiligen Ergebnissen der initialen zytologischen Untersuchung aufgeführt.

453 (83,58%) der beidseitigen Pleuraergüsse waren negativ, 54 (9,96%) positiv, 33 (6,09%) zweifelhaft und 2 (0,37%) dringend verdächtig.

Von den Pleuraergüssen, die auf der rechten Seite lokalisiert waren 288 (67,76%) negativ, 105 (24,71%) positiv, 23 (5,41%) zweifelhaft und 9 (1,99%) dringend verdächtig.

Die Pleuraergüsse der linken Seite waren bei 218 (67,28%) Fällen negativ, bei 76 (23,46%) positiv, bei 22 (6,79%) zweifelhaft und bei 8 (2,47%) dringend verdächtig.

Zusammengefasst heißt das, dass die negativen Ergüsse mit 453 am häufigsten beidseits lokalisiert waren, die positiven mit 105 am häufigsten rechts.

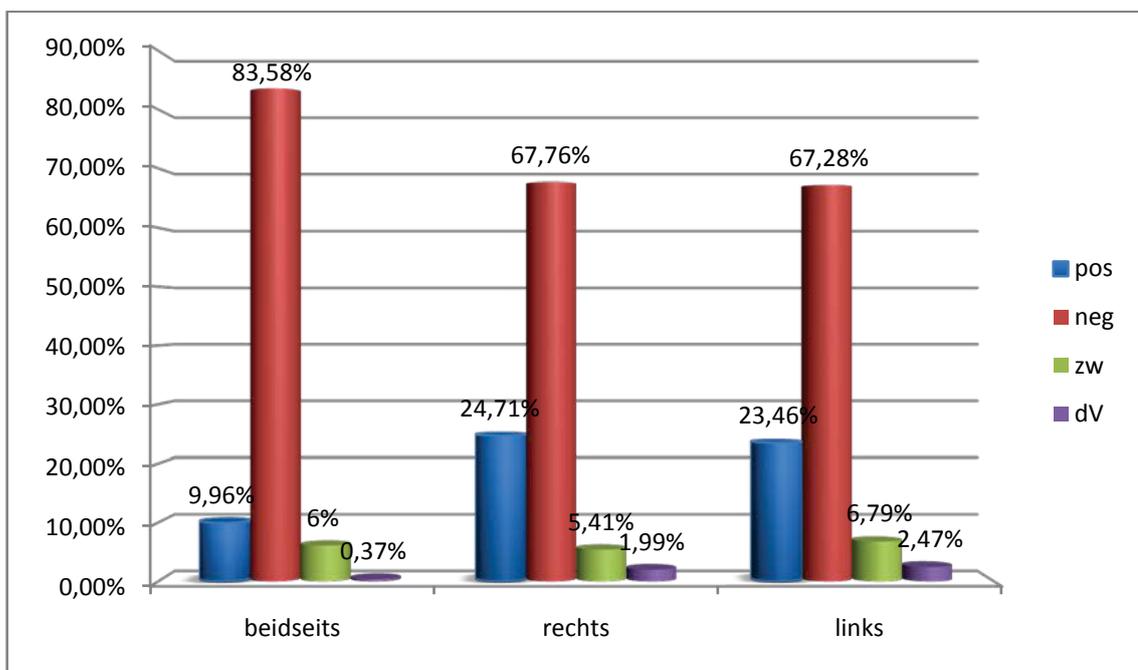


Abbildung 12 Häufigkeitsverteilung der Pleuraergüsse nach Lokalisation nach initialer Zytologie

3.4 Verteilung der Pleuraergüsse nach Patientenalter

Schaut man sich die Altersverteilung der 1437 Patienten der Kohorte an, zeigt sich, dass Ergüsse der Pleura in jeder Altersgruppe vorkommen können. Das Alter der Patienten reichte von 2-97 Jahren, wobei eine Häufung der Ergüsse bei Patienten über 60 Jahren auftrat.

Am häufigsten war die Gruppe der 70-80 Jährigen von einem Erguss betroffen.

In Abbildung 13 sind alle positiven und negativen Pleuraergüsse aus dem Untersuchungszeitraum nach Alter (y-Achse) und Häufigkeit (x-Achse) aufgeführt.

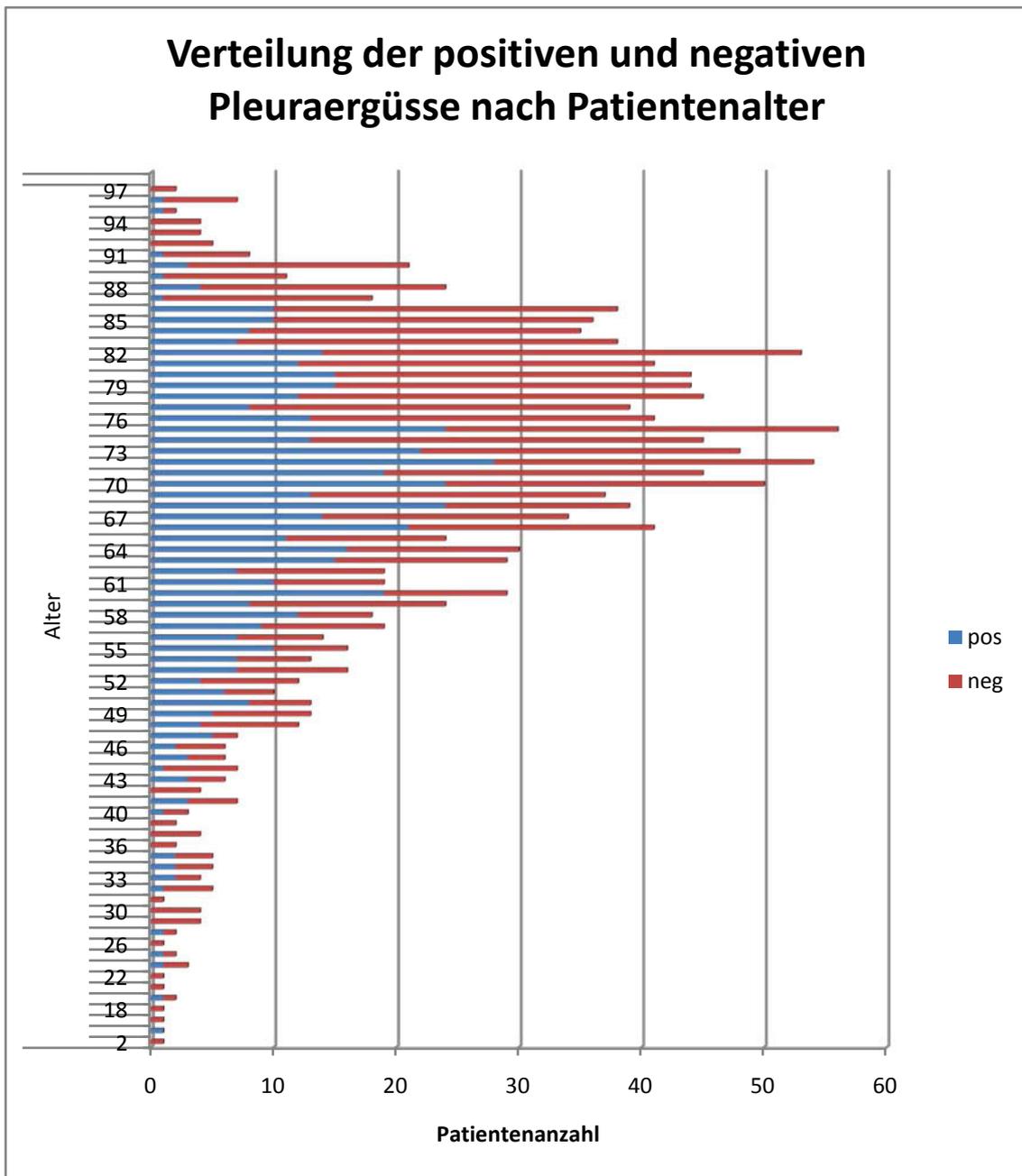


Abbildung 13 Altersverteilung der positiven und negativen Pleuraergüsse im Untersuchungszeitraum laut Referenzstandard

Betrachtet man nur die Ergüsse mit positivem Referenzstandard, dann sind die Patienten zwischen 70 und 80 Jahren mit einem Gipfel bei 72 Jahren am häufigsten von einer Pleurakarzinose betroffen. Häufigkeit (x-Achse).

3.5 Lokalisation des Primarius bei malignem Pleuraerguss

Dieser Abschnitt behandelt die Lokalisation des in die Pleura metastasierten Primärtumors. Diese Auswertung spiegelt die klinischen Angaben wieder.

Am häufigsten für einen malignen Pleuraerguss verantwortlich sind mit 40,1% metastasierende Lungenkarzinome, gefolgt von Mammakarzinomen mit 17,4%, Karzinomen des Gastrointestinaltraktes mit 8,6% und Leukämien/ Lymphomen mit 5,8%. Als eigenständiger in der Pleura entstandener Tumor hat das Pleuramesotheliom einen Anteil von 2,8%.

In Abbildung 14 sind die malignen Tumore aufgeführt, die prozentual am häufigsten für die Entstehung einer Pleurakarzinose verantwortlich waren.



Abbildung 14 Die am häufigsten in die Pleura metastasierenden Tumore

Betrachtet man die Verteilung der malignen Primärtumore bei Frauen und Männern getrennt voneinander, ist bei Frauen der am häufigsten in die Pleura metastasierende Primarius ein Mammakarzinom mit 33,2%.

Es folgen Lungenkarzinome mit 29,4% und Ovarialkarzinome mit 9%.

Bei Männern liegt dagegen der metastasierende Primarius mit 52% meist in der Lunge, gefolgt von Karzinomen des Gastrointestinaltraktes mit 10,9% und Leukämien/Lymphomen mit 5,1%.

In Abbildung 15 und Abbildung 16 sind alle malignen Tumore, die bei der vorliegenden Patientenkohorte in die Pleura metastasiert haben, nochmals prozentual getrennt nach Frauen und Männern in absteigender Reihenfolge aufgeführt.

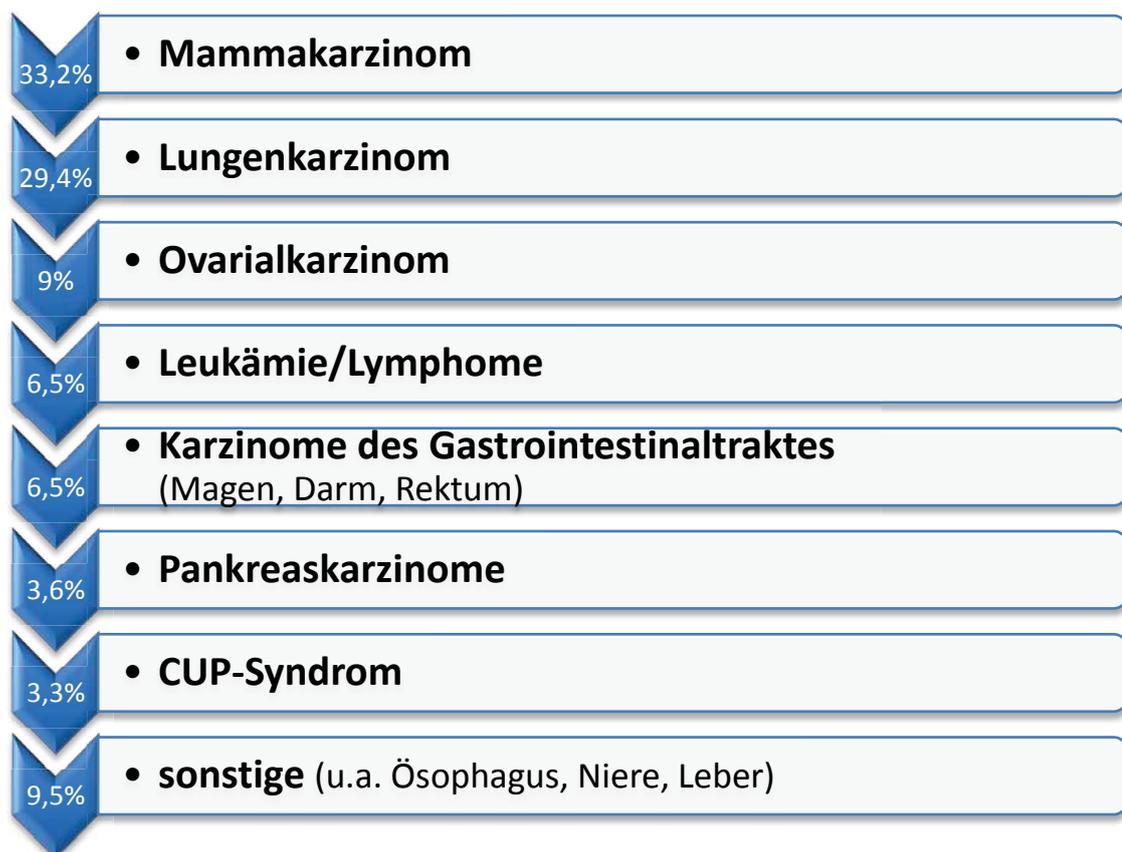


Abbildung 15 Die am häufigsten in die Pleura metastasierenden Tumore bei Frauen



Abbildung 16 Die am häufigsten in die Pleura metastasierenden Tumore bei Männern

3.6 Treffsicherheiten der Zytologie

Um die Frage zu beantworten wie spezifisch die positive Aussage einer zytologischen Diagnose mit und ohne adjuvante Methoden ist, wird eine Auswertung durchgeführt, in der die dringend verdächtigen und die zweifelhaften zytologischen Diagnosen als nicht positiv gewertet werden (Auswertungsvariante 1).

Außerdem erfolgte eine Auswertung, in der die dringend verdächtigen und die zweifelhaften zytologischen Diagnosen als positiv gewertet wurden, um eine Aussage darüber zu erhalten, wie sensitiv die Zytologie alleine und mit adjuvanten Methoden ist (Auswertungsvariante 2).

Zur Vollständigkeit wird noch eine Auswertung angefügt, in der die dringend verdächtigen Fälle als positiv und die zweifelhaften als negativ gewertet wurden (Auswertungsvariante 3).

3.6.1 Treffsicherheiten der alleinig morphologiebasierten Zytologie (Basiszytologie)

In Tabelle 11 sind die drei verschiedenen Auswertungsvarianten und deren Ergebnisse für die Sensitivität und Spezifität der alleinigen morphologiebasierten Zytologie aufgeführt.

Wertet man die dringend verdächtigen und zweifelhaften Fälle als positiv (Auswertungsvariante 1), ergibt sich für die Basiszytologie eine Sensitivität von 49,16% und eine Spezifität von 100% sowie einen positiven prädiktiven Wert (PPW) von 100% und einen negativen prädiktiven Wert (NPW) von 76,94%. Die Gesamttreffsicherheit liegt hier bei 81,11%.

In der Auswertungsvariante 2, wo die dringend verdächtigen und die zweifelhaften Fälle als positiv gewertet wurden liegt die Sensitivität bei 59,84% und die Spezifität bei 94,24%. Der PPW liegt bei 85,98% der NPW bei 78,17%. Die Gesamttreffsicherheit liegt hier bei 81,49%.

Die Auswertungsvariante 3 (dringend verdächtige= positiv und zweifelhafte= negativ) ergibt eine Sensitivität von 52,91% und eine Spezifität von 99,44%. Der PPW liegt bei dieser Variante bei 98,76% der NPW bei 78,17% die Gesamttreffsicherheit bei 82,18%.

Tabelle 11 Auswertungsvarianten zur Sensitivität und Spezifität der alleinigen morphologiebasierten Zytologie (bei verschiedener Beurteilung zweifelhafter und dringend verdächtiger Fälle)

Auswertungsvariante	1	2	3
	dV/zw= nicht positiv	dV/zw= positiv	dV= positiv; zw= negativ
richtig positiv	18,23% (n=262)	22,20% (n=319)	19,62% (n=282)
falsch positiv	0% (n=0)	3,62% (n=52)	0,35% (n=5)
richtig negativ	62,91% (n=904)	59,29% (n=852)	62,56% (n=899)
falsch negativ	18,86% (n=271)	14,89% (n=214)	17,47% (n=251)
PPW	100%	85,98%	98,76%
NPW	76,94%	79,92%	78,17%
Gesamttreffsicherheit	81,11%	81,49%	82,18%
Sensitivität	49,16%	59,84%	52,91%
Spezifität	100%	94,24%	99,44%

PPW= positiver prädiktiver Wert; NPW= negativer prädiktiver Wert

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der drei Auswertungsvarianten zur Sensitivität und Spezifität der alleinigen morphologiebasierten Zytologie grafisch durch ein Säulendiagramm dargestellt.

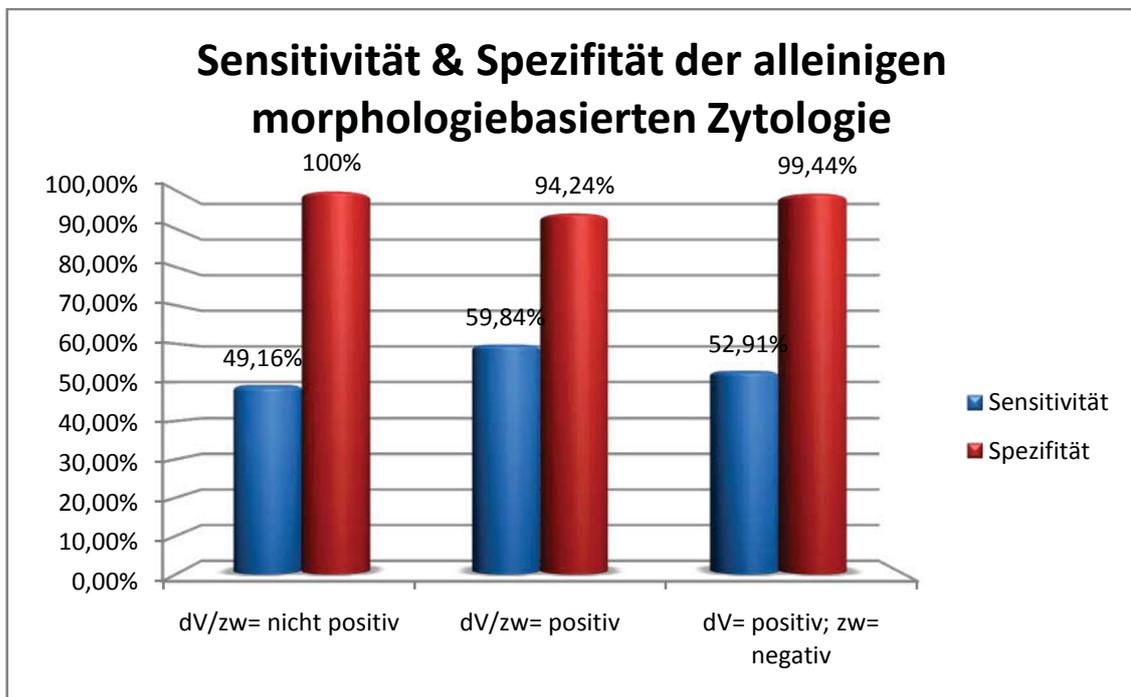


Abbildung 17 Sensitivität und Spezifität der alleinigen morphologiebasierten Zytologie anhand der verschiedenen Auswertungsvarianten (dV= dringender Verdacht; zw= zweifelhaft)

3.6.2 Treffsicherheiten der alleinig morphologiebasierten Zytologie (Basiszytologie) mit adjuvanten Methoden

Im Folgenden wird an Hand der drei Auswertungsvarianten der potentielle Zugewinn an diagnostischer Treffsicherheit durch den Einsatz adjuvanter Methoden untersucht.

Bei 92 Patienten der Kohorte wurde zur weiteren Abklärung des Pleuraergusses nach der Basiszytologie eine adjuvante Methode angewandt. In allen 92 Fällen erfolgte eine immunzytologische Untersuchung, in drei Fällen erfolgte neben der Immunzytologie noch eine weitere Diagnostik, 2mal eine AgNOR-Analyse und 2mal eine DNA-Bildzytometrie (Tabelle 12).

Tabelle 12 In der vorliegenden Kohorte angewandte adjuvante Methoden

Adjuvante Methode	Fälle
Immunzytologie	89
Immunzytologie+AgNOR+DNA-Bildzytometrie	1
Immunzytologie+AgNOR	1
Immunzytologie+DNA-Bildzytometrie	1

Es handelt sich nach initialer Zytologie um 63 zweifelhafte, 15 dringend verdächtige und 14 negative Diagnosen. Bei 11 Patienten brachte auch die adjuvante Methode keine Klärung, so dass die initiale zytologische Diagnose weiterhin Bestand hatte.

Tabelle 13 zeigt die bei den immunzytologischen Untersuchungen angewendeten Marker deren Fragestellung in Bezug auf die Tumorart und die Häufigkeit ihrer Anwendungen.

Tabelle 13 Immunzytologisch eingesetzte Marker

Fragestellung	Marker	Anzahl der Anwendung
<i>Epithel?</i>	HEA 125	80
	BerEP4	84
<i>Mesothel?</i>	Calretinin	5
	EMA	2
	WT1	2
	Desmin	1
	CD 68	1
<i>Lymphatisch bzw. B- vs. T-Zellen?</i>	CD 20	9
	CD 45Ro	9
	CD 79a	1

Auswertungsvariante 1 (dringender Verdacht/zweifelhaft= nicht positiv) ergibt eine Sensitivität von 53,47% und eine Spezifität von 100%. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Basiszytologie (Sensitivität 49,16% und Spezifität 100%) steigt die

Sensitivität durch den zusätzlichen Einsatz einer adjuvanten Methode um 4,31 Prozentpunkte. Der positive prädiktive Wert (PPW) liegt bei 100% der negative prädiktive Wert (NPW) bei 78,47%. Die Gesamttreffer sicherheit, d.h. alle richtig klassifizierten Fälle, ist 82,74%.

Die Auswertungsvariante 2 (dV/zw= positiv) ergibt eine Sensitivität von 57,97% und eine Spezifität von 98,01%. Dies bedeutet im Vergleich zur Basiszytologie (Sensitivität 59,84% und Spezifität 94,24%) eine Abnahme der Sensitivität um 1,87 Prozentpunkte und eine Steigerung der Spezifität um 3,77 Prozentpunkte. Der PPW liegt hier bei 94,45% der NPW bei 79,82% und die Gesamttreffer sicherheit bei 83,16%.

In Auswertungsvariante 3 (dV= positiv; zw= negativ) ergibt sich für die Basiszytologie mit adjuvanter Methode eine Sensitivität von 55,35% und eine Spezifität von 99,67%. Dies bedeutet im Vergleich mit der Zytologie alleine (Sensitivität 52,91% und Spezifität 99,44%) eine Steigerung der Sensitivität um 2,44 Prozentpunkte bei unveränderter Spezifität. Bei dieser Auswertungsvariante erhalten wir einen PPW von 98,99% und einen NPW von 79,10%. Die Gesamttreffer sicherheit liegt hier bei 83,29%.

In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der drei Auswertungsvarianten nochmals getrennt voneinander aufgeführt.

Tabelle 14 Auswertungsvarianten zur Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit adjuvanten Methoden

Auswertungsvariante	1	2	3
	dV/zw= nicht positiv	dV/zw= positiv	dV= positiv; zw= negativ
richtig positiv	19,83% (n=285)	21,5% (n=309)	20,53% (n=295)
falsch positiv	0% (n=0)	1,25% (n=18)	0,21% (n=3)
richtig negativ	62,91% (n=904)	61,66% (n=886)	62,7% (n=901)
falsch negativ	17,26% (n=248)	15,59% (n=224)	16,56% (n=238)
PPW	100%	94,45%	98,99%
NPW	78,47%	79,82%	79,10%
Gesamttreffer sicherheit	82,74%	83,16%	83,29%
Sensitivität	53,47%	57,97%	55,35%
Spezifität	100%	98,01%	99,67%

PPW= positiver prädiktiver Wert; NPW= negativer prädiktiver Wert

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse zur Sensitivität und Spezifität der Basiszytologie mit adjuvanter Methode an Hand eines Säulendiagramms.

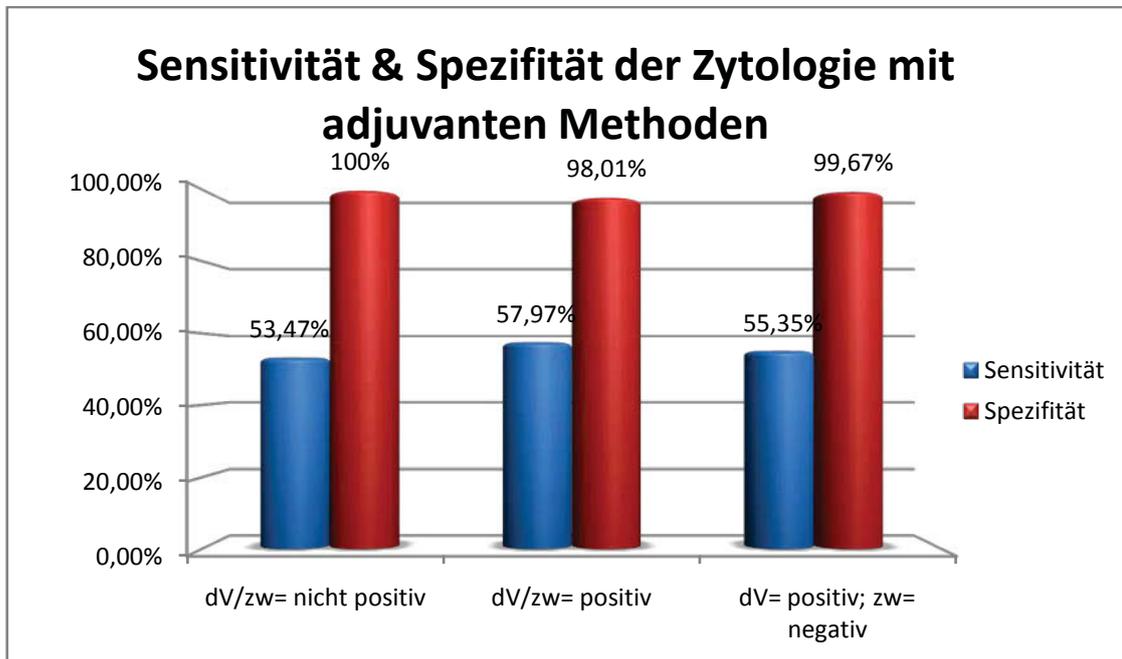


Abbildung 18 Sensitivität und Spezifität der Zytologie mit adjuvanen Methoden anhand der verschiedenen Auswertungsvarianten (dV= dringender Verdacht; zw= zweifelhaft)

3.6.3 Sensitivität und Spezifität der adjuvanen Methoden alleine

Wertete man die adjuvanen Methoden alleine losgelöst von der Basiszytologie aus, erhält man 92 Einzelfälle, bei denen nach der Basiszytologie noch eine weiterführende Diagnostik erfolgte.

Diese erbrachte 60 negative und 21 positive Befunde. Bei 6 initial zytologisch zweifelhaften sowie 3 initial zytologisch dringend verdächtigen Fällen erbrachte die adjuvante Methode keine Klärung, so dass diese unklaren Diagnosen bestehen blieben. Zwei initial zytologisch zweifelhafte Fälle wurden zu dringend verdächtigen.

Nach Auswertung mit Hilfe des Vierfeldertafelschemas (Kap. 2.7.1) ergibt sich für die adjuvanen Methoden alleine eine Sensitivität von 65,71% und eine Spezifität von 100%. Die Gesamttreffericherheit beträgt 85,18% der positive prädiktive Wert liegt bei 100% der negative prädiktive Wert bei 79,31%.

In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der oben genannten Auswertung nochmals aufgeführt.

Tabelle 15 Gesamtreffsicherheit, positiver und negativer prädiktiver Wert, Sensitivität und Spezifität der adjuvanten Methoden alleine

Adjuvante Methode	Ergebnisse
richtig positiv	28,4% (n=23)
falsch positiv	0% (n=0)
richtig negativ	56,79% (n=46)
falsch negativ	14,81% (n=12)
PPW	100%
NPW	79,31%
Gesamtreffsicherheit	85,18%
Sensitivität	65,71%
Spezifität	100%

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse zur Sensitivität und Spezifität der adjuvanten Methoden alleine nochmals an Hand eines Säulendiagramms

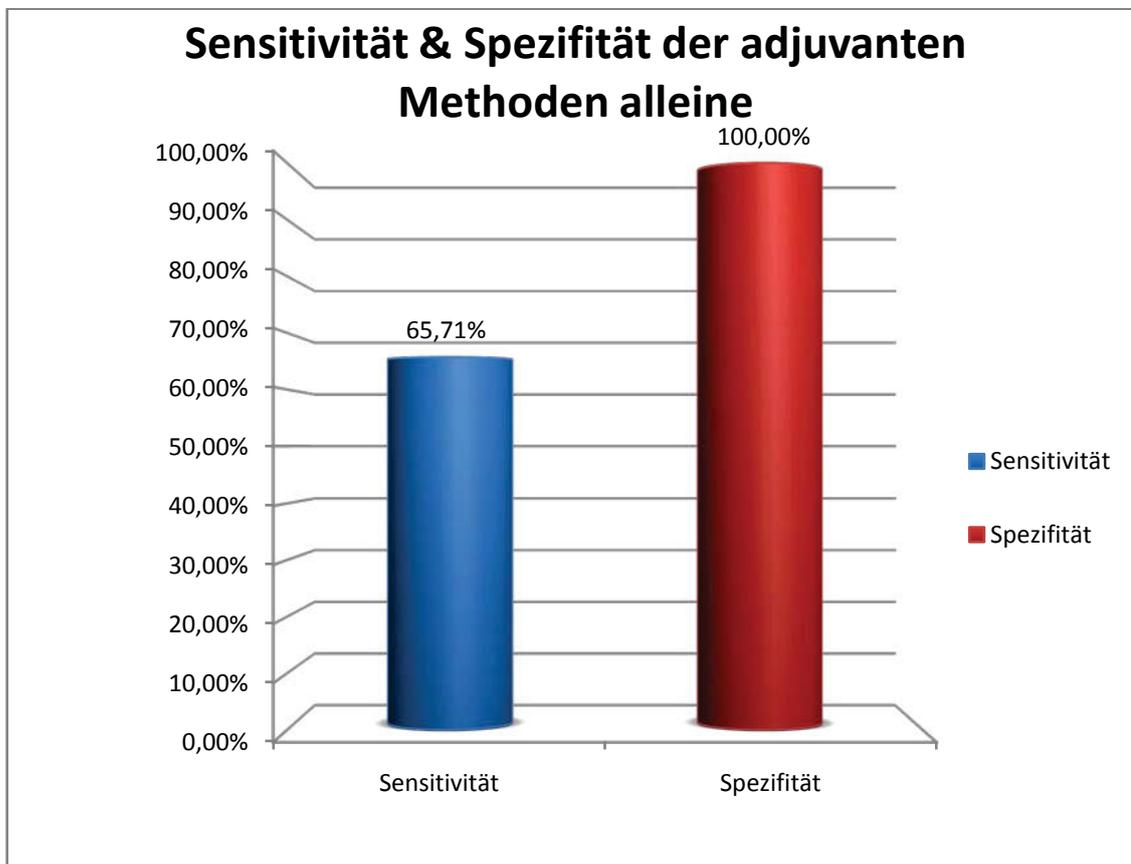


Abbildung 19 Sensitivität und Spezifität der adjuvanten Methoden alleine

3.7 Aufklärungsquote zweifelhafter und dringend verdächtiger Fälle durch adjuvante Methoden

Schaut man sich an, in wie vielen der nach Basiszytologie unklaren 92 Fälle durch den Einsatz der adjuvanten Methoden eine Aufklärung der Dignität erfolgte, erhält man einen Wert von 75% (n=69), d.h. in 69 von 92 Fällen wurde die richtige, tumorpositive oder -negative Diagnose gestellt. In 13% der Fälle (n=12) wurde durch die adjuvante Methode eine falsche Diagnose gestellt. Bei 9,8% (n=9) der Fälle blieb auch nach Einsatz der adjuvanten Methode die Verdachtsdiagnose der Zytologie aufgrund zu geringer Zahl suspekter Zellen bestehen. Bei 2,2% (n=2) der Fälle wurde die zweifelhafte Verdachtsdiagnose in einen dringenden Verdacht umgewandelt, der mittels Follow-Up bestätigt bzw. widerlegt wurde.

In Abbildung 20 werden die durch adjuvante Methoden aufgeklärten, nicht aufgeklärten, sowie die weiterhin unklaren Fällen prozentual an Hand eines Säulendiagramms dargestellt.

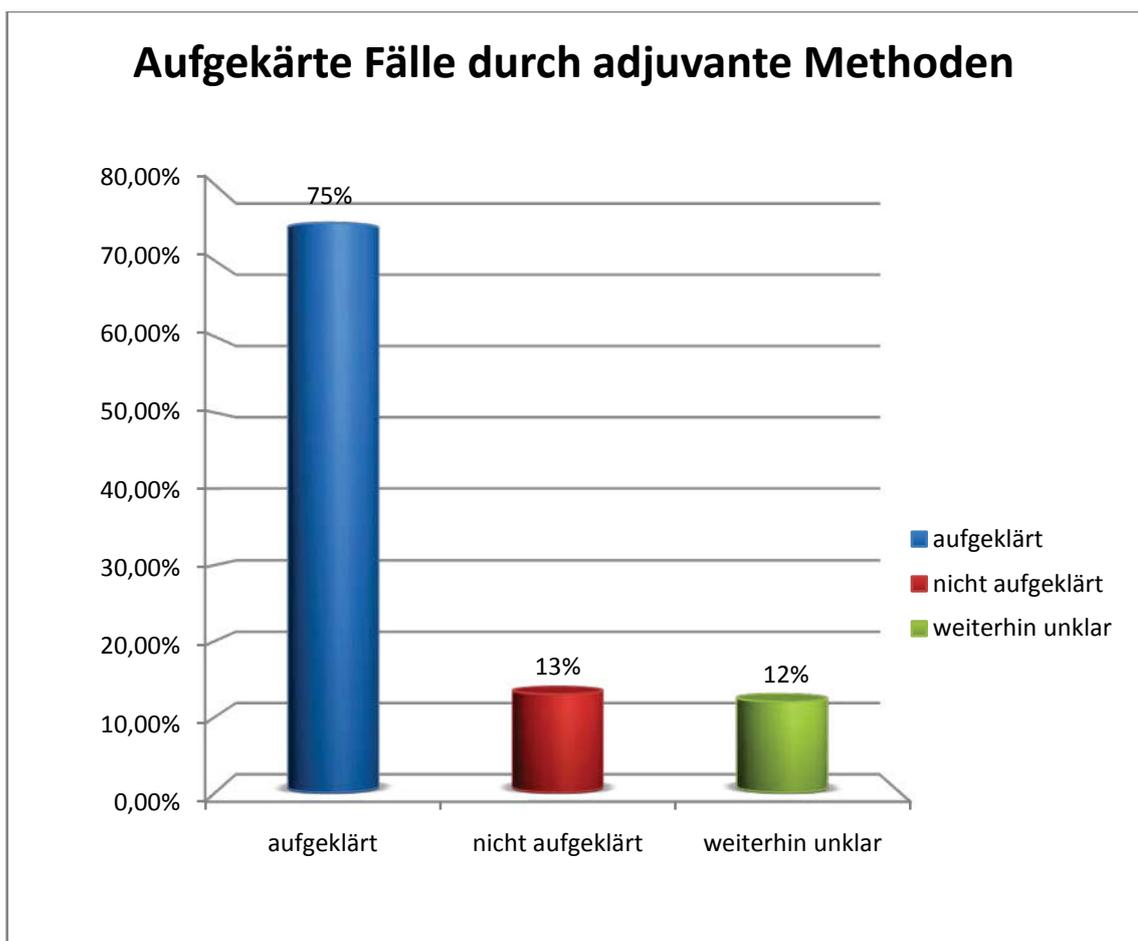


Abbildung 20 Durch adjuvante Methoden aufgeklärte Fälle in %

In Tabelle 16 sind die 12 Fälle aufgeführt, die nach unserem Referenzstandard durch den Einsatz einer adjuvanten Methode falsch diagnostiziert wurden; es handelt sich um 12 falsch-negative Fälle.

Tabelle 16 Durch eine adjuvante zytologische Methode falsch diagnostizierte Fälle

initiale zytologische Diagnose	angewandte adjuvante Methode	Ergebnis adj. Methode	Diagnose Erkrankung laut Follow-Up
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	Magenkarzinom
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	Mammakarzinom
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	T-Zell-Lymphom
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	Bronchialkarzinom
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	Mammakarzinom
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	Ovarialkarzinom
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	Urothelkarzinom
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	Pankreaskarzinom
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	Bronchialkarzinom
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	Bronchialkarzinom
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	Prostatakarzinom
zweifelhaft	Immunzytochemie	negativ	Mammakarzinom

adj. = adjuvant

3.8 Treffsicherheit adjuvanter zytologischer Methoden bei der Tumortypisierung

Nimmt man die Patienten, die die Einschlusskriterien für die Tumortypisierung (s. Kap.2.5) erfüllen, erhält man eine Patientenkohorte von 90 Patienten, bei denen nach positiver zytologischer Diagnose eine anschließende Tumortypisierung mit Hilfe einer adjuvanten Methode stattgefunden hat.

Bei 94,4% der Patienten (n=85) wurde der Tumor richtig typisiert. In 5,6% (n=5) der Fälle erfolgte eine falsche Typisierung (Abbildung 21).

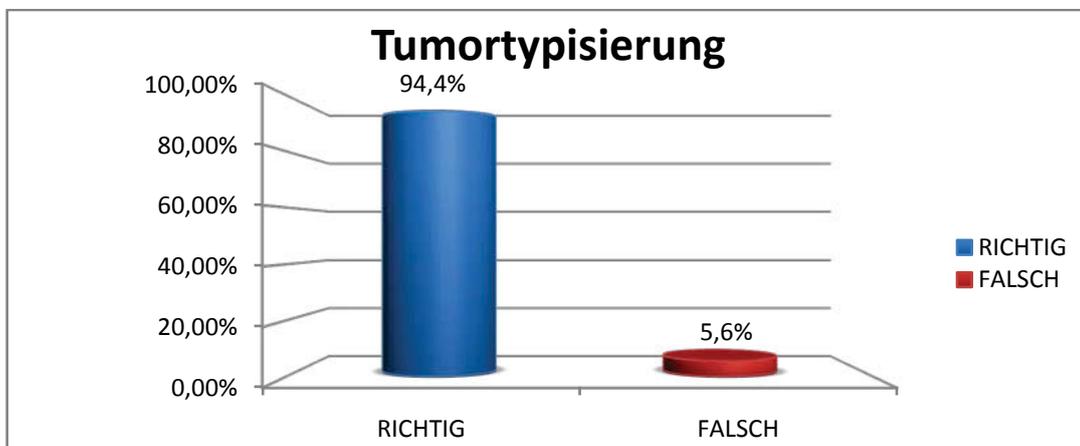


Abbildung 21 Treffsicherheit adjuvanter zytologischer Methoden bei der Tumortypisierung %

Tabelle 17 zeigt die 5 falsch typisierten Fälle mit der von der Zytologie gestellten Diagnose, Differentialdiagnose, den verwendeten Tumormarkern und der tatsächlichen Tumorart.

Tabelle 17 Nach Follow-Up zytologisch falsch typisierte Tumore

zytologische Tumortypisierung/DD	Tumorart nach Follow-Up	Tumormarker
ColonCa/DD: Pankreas- /MagenCa	Pleura- mesotheliom	CK5/6: starke fokale Expression, Score 3 CK 7: geringe fokale Expression, Score 1. CK20: fast homogene Expression, Score 4 cdx 2: keine Expression, Score 0. TTF1: keine Expression, Score 0.
OvarialCa	MammaCa	CA 125: fast homogene Expression, Score 4. CEA: geringe fokale Expression, Score 1. Mammoglobin: keine Expression, Score 0. Beta-Catenin :keine intranukleäre Expression, Score 0.
Magen- /PankreasCa/ DD: BronchialCa	MammaCa	CK5/6: starke fokale Expression, Score 3. CK7: starke homogene Expression, Score 4. CK20: fast homogene Expression, Score 4. CA 125: geringe fokale Expression, Score 2. cdx 2 : keine Expression, Score 0. TTF1: starke fast homogene intranukleäre Expression, Score 0.
ColonCa/ DD: Magen- /PankreasCa	NierenzellCa	CK5/6: fokale Expression, Score 2. CK7: starke homogene Expression, Score 5. CK20: starke homogene Expression, Score 5 Pax-2 : keine Expression, Score 0. TTF1: keine Expression, Score 0. cdx 2 : fast homogene intranukleäre Expression, Score 4
BronchialCa	ColonCa	CK5/6: keine Expression, Score 0 CK7: starke homogene Expression, Score 5 CK20: keine Expression, Score 0 Ca 125 : fast homogene Expression, Score 4 cdx-2 : keine Expression, Score 0 TTF1: starke fokale intranukleäre Expression, Score 3

DD= Differentialdiagnose, Ca= Karzinom

4 Diskussion

In der Literatur sind über fünfzig verschiedene Erkrankungen beschrieben, die zur Entstehung einer pathologischen Flüssigkeitsansammlung in der Pleurahöhle führen können (Bedrossian, 1994). Das Spektrum reicht hierbei (ohne Anspruch auf Vollständigkeit) von kardialen über entzündliche, allergische, rheumatische und traumatische bis hin zu malignen Ursachen. Da somit ein Pleuraerguss eine Vielzahl von Ursachen haben kann und laut Literatur in über 40% der Fälle die Ursache auf eine maligne Erkrankung zurückzuführen ist (Haam, 1977), (Bedrossian, 1994), (Hausheer und Yarbro, 1985) kommt der frühzeitigen Beurteilung der Genese und Dignität des Ergusses ein hoher Stellenwert zu.

Die Pleurapunktion mit anschließender zytologischer Untersuchung der Ergussflüssigkeit stellt dabei eine wenig invasive und kostengünstige, auch ambulant durchführbare Methode dar und gehört daher zu den Routineverfahren bei der Behandlung und Diagnostik eines Pleuraergusses. So liefert die Zytodiagnostik in 45% der malignen Pleuraergüsse den ersten Hinweis auf einen malignen Primärtumor des Patienten (initiales CUP-Syndrom) (Bedrossian, 1994). Die Zytologie zeigt in Bezug auf die Treffsicherheit hervorragende Ergebnisse mit nahezu 100% bei der Spezifität. Demgegenüber steht allerdings eine verbesserungswürdige Sensitivität von nur 43-67% (Spriggs und Boddington, 1989).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik von Pleuraergusseinsendungen aus den Jahren 2010 und 2011 in die Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu bestimmen. Hierzu wurden die Krankheitsverläufe der Patienten durch Einsichtnahme in die Krankenakten verfolgt. Es wurde ein besonderes Augenmerk auf die alleinige zytologische Untersuchung im Vergleich mit zytologischer Untersuchung plus adjuvanten Methoden gelegt, um Aussagen über den Zugewinn durch die Anwendung adjuvanter Methoden machen zu können. Als adjuvante Methoden wurden die Immunzytochemie, AgNOR-Analyse und DNA-Bildzytometrie eingesetzt.

Ebenfalls interessant sind die Ergebnisse im Vergleich zu älteren Studien, auf die im Folgenden noch näher eingegangen wird, in Hinblick auf die Weiterentwicklung der Zytologie in den letzten Jahren. Die ältesten Studien zum Thema reichen bis in die 60er Jahre zurück. So haben sich damals schon Lopes Cardoso et al. (1966) und Spriggs und Boddington (1968) mit diesem Thema beschäftigt. Eine aktuellere Studie zu diesem Thema (ebenfalls aus dem Institut für Cytopathologie der Heinrich-Heine-

Universität Düsseldorf) wurde von Motherby et al. 1998 durchgeführt. Es gibt drei größere Studien (Lopes-Cardoso, 1966), (Spriggs und Boddington, 1968), (Mouriquand et al., 1977) mit Fallzahlen von über tausend Patienten, die aber mittlerweile schon zwischen 37 und 48 Jahren alt sind. Eine neuere große Studie, die sich allerdings mit Ergüssen aller serösen Körperhöhlen beschäftigt, stammt aus dem Jahr 2008 von Metzgeroth. Da die Anzahl an neueren Studien in Bezug auf Sensitivität und Spezifität der Zytologie in der Pleuraergussdiagnostik sehr gering ist und größere Studien schon über dreißig Jahre zurückliegen, stellt sich die Frage, ob Weiterentwicklungen bzw. Veränderungen der entsprechenden zytologischen Untersuchungsmethoden zu einer Verbesserung der Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik geführt haben. Dies sollte anhand einer recht großen retrospektiven Kohorte, bestehend aus Pleuraerguss-Ersteinsendungen von letztlich 1437 eingeschlossenen Patienten, geklärt werden.

4.1 Kohorte

Die tatsächliche Ergussursache wurde nach einem vorab definierten Referenzstandard mittels Einsicht in die Patientenakten (klinisches Follow-Up) ermittelt. Für 151 Patienten entsprach die Qualität des Follow-Up nicht dem Referenzstandard. Diese Patienten wurden vorab aus der Studie ausgeschlossen. Es verblieben für die Auswertung 1437 Patienten.

37,1% der 1437 Pleuraergüsse hatten entsprechend der Follow-Up-Daten eine maligne, 62,9% eine benigne Genese. Im Vergleich mit Werten aus der Literatur (Haam, 1977, Bedrossian, 1994, Hausheer und Yarbro, 1985), die die Häufigkeit der malignen Pleuraergüsse zwischen 43-45% angeben, liegen die jetzt ermittelten Werte unterhalb der Literaturangaben. Den geringeren Anteil an Pleurakarzinosen in der vorliegenden Patientenkohorte könnte man in Anbetracht des Alters der vorliegenden Vergleichsstudien mit einer Verbesserung der onkologischen Therapie in den letzten Jahren begründen, die zu einer Verringerung der Metastasierung in die Pleura geführt haben könnte. So gibt auch das Robert-Koch-Institut 2010 einen Rückgang von 20% für die Sterberate durch Krebserkrankungen an.

Die Verteilung der Pleuraergüsse nach Geschlecht war recht gleichmäßig. So entwickeln Männer mit 54,3% etwas häufiger einen Pleuraerguss als Frauen mit 45,7%. Auffällig ist allerdings, dass bei Frauen, obwohl sie seltener einen Pleuraerguss entwickelten, häufiger als bei den Männern ein maligner Erguss vorlag. So ist bei 42,2% der weiblichen Patienten der Pleuraerguss maligne. Im Gegensatz dazu liegt bei Männern nur in 32,8% der Fälle ein bösartiger Erguss vor.

Die höhere Prävalenz an malignen Pleuraergüssen bei Frauen gegenüber denen bei Männern (42,2% zu 32,8%) in der vorliegenden Kohorte lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die beiden für eine Pleurakarzinose bei Frauen hauptverantwortlichen Tumoren (Lungenkarzinom 29,4% und Mammakarzinom 33,2%) beide nahe der Pleura lokalisiert sind. Mammakarzinome kommen fast ausschließlich bei Frauen vor. Die Anzahl der männlichen Brustkrebspatienten liegt bei <1% der (Contractor et al., 2008).

Bei 1292 Einsendungen der Kohorte war die Lokalisation des Pleuraergusses angegeben. Die Auswertung ergab, dass sich 42% auf beiden Seiten befanden, 32,9% auf der rechten und 25,1% auf der linken Seite. Betrachtet man nun die positiven und die negativen Ergüsse getrennt voneinander, so befinden sich positive Ergüsse etwas häufiger rechts (39,4%) als links (32,3%) bzw. beidseits (28,3%). Die Seitendifferenzen bleiben auch in der Literatur unklar. Die nach Referenzstandard negativen Ergüsse liegen zu 49,9% beidseits, zu 29,2% rechts und zu 20,9% links. Für die rechtsseitig entsprechend klinischer Erfahrung häufiger auftretenden kardialen Stauungsergüsse werden verschiedene in einer Veröffentlichung von Natanzon und Mitarbeitern (Natanzon et al, 2009) einander gegenübergestellte Ursachen genannt (z.B. Vena-azygos-Theorie), welche aber allesamt nicht allgemein akzeptiert sind.

4.2 Lokalisation der häufigsten eine Pleurakarzinose verursachenden Primärtumore

Verschiedene Arbeitsgruppen um Salyer 1975, Chernow 1977, Johnston 1985, Sears 1987, Hsu 1987 und Gupta 2012 beschäftigten sich mit dem Thema, welche Tumore meist für einen malignen Pleuraerguss verantwortlich waren. Schaut man sich die Ergebnisse aller Gruppen in Zusammenschau an, lag der Primärtumor am häufigsten in der Lunge. Eine Ausnahme bildete nur die Kohorte von Sears, wo das Mammakarzinom geringfügig häufiger als Primarius auftrat als das Lungenkarzinom. Nimmt man die Ergebnisse aller fünf Studiengruppen zusammen, erhält man folgende, in Tabelle 18 aufgeführte Statistik.

Tabelle 18 Zusammenfassung der Ergebnisse von Salyer 1975, Chernow 1977, Johnston 1985, Sears 1987, Hsu 1987 und Gupta 2012 zur Lokalisation der am häufigsten für maligne Pleuraergüsse verantwortlichen Primärtumore

Primärtumor	Fälle Total (%)
Lunge	874(35,8%)
Brust	427(17,5%)
Lymphome	290(11,9%)
CUP	269(11,0%)
Urogenital	229(9,4%)
Gastrointestinal	149(6,1%)
Andere	202(8,3%)

Bei Frauen ist das Mammakarzinom (37,4%) und bei Männern das Lungenkarzinom (49,1%) die häufigste Ursache für einen malignen Pleuraerguss (Johnston, 1985).

Die Tumorarten, die in der vorliegenden Arbeit mit Abstand am meisten in die Pleura metastasiert haben, sind mit 40,1% das Lungenkarzinom vor dem Mammakarzinom mit 17,4%, malignen Tumoren des Gastrointestinaltraktes mit 8,6%, Leukämien und Lymphomen mit 5,8% und Ovarialkarzinomen mit 4,6%.

Bei Frauen metastasierte mit 33,2% das Mammakarzinom, bei Männern mit 52% das Lungenkarzinom am häufigsten in die Pleura.

Bei Frauen ist das Lungenkarzinom mit 29,4% die zweithäufigste Ursache für eine Pleurakarzinose. Lungenkarzinome werden zu 78% in einem lokal bereits fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium diagnostiziert und haben bereits initial oft die Pleura befallen (SEER cancer statistics review, 2011). Die erhöhte Wahrscheinlichkeit bei Männern gegenüber Frauen, an einer durch ein Lungenkarzinom verursachten Pleurakarzinose zu erkranken, ist in erster Linie auf die unterschiedliche Exposition gegenüber Risikosubstanzen für das Lungenkarzinom zurückzuführen. So rauchen nach dem Mikrozensus 2009 des Statistischen Bundesamtes 33,2% der deutschen Männer und 22,3% der deutschen Frauen über 15 Jahren (Statistisches Bundesamt, 2010). Wenn man sich die letzten 20 Jahre anschaut, hat sich infolge des zunehmenden Anteils der Raucherinnen die Zahl der Lungenkrebserkrankungen bei Frauen mehr als verdoppelt (Bühning, 2008). Der trotz der Zunahme an Raucherinnen doch recht hohe Unterschied von 52% der durch Lungenkarzinome verursachten Pleurakarzinosen bei Männern gegenüber 29,4% bei

Frauen, kann damit begründet werden, dass der Anteil an männlichen Rauchern immer noch fast zehn Prozent über dem der weiblichen liegt und Männer häufiger beruflich inhalativen kanzerogenen Noxen ausgesetzt (Asbest, Arsen, Nickel, Chrom) sind.

Die aktuellen Ergebnisse dieser Arbeit zur Lokalisation der eine Pleurakarzinose verursachenden Primärtumore spiegeln weitestgehend die Ergebnisse der anderen Studiengruppen wieder. Allerdings findet man einen von knapp 6% geringeren Anteil an von durch Leukämien und Lymphomen verursachten malignen Pleuraergüssen in der vorliegenden Arbeit. Dies, sowie die geringeren prozentualen Unterschiede der anderen oben genannten Tumoren im Vergleich zur Literatur mag zum einen in der verbesserten onkologischen Therapie gegenüber den Jahren 1975-1987 liegen, aus denen fünf der sechs oben genannten Studien stammen. Außerdem kann durch die Unterschiede in den Behandlungsschwerpunkten der einsendenden Kliniken (z.B. Pneumologie vs. Hämatologie/Onkologie), zum anderen aber auch in den Patientenkohorten die geringe prozentuale Abweichung begründet sein. Trotz der großen Kohorte sind einzelne Tumorentitäten noch in einem Häufigkeitsbereich, der statistische Abweichungen verschiedener Studien von wenigen Prozent zulässt.

4.3 Treffsicherheit der Basiszytologie

In den letzten Jahrzehnten haben sich zahlreiche Studien mit der Treffsicherheit der Pleuraergusszytologie auseinandergesetzt. Die Tabelle 4 und Tabelle 5 in Kapitel 1.3.2 geben einen Überblick über Studien der letzten 48 Jahre.

Sämtliche Studien zeigen eine sehr gute Spezifität der Zytologie, die zwischen 91% und 100% liegt. Demgegenüber steht aber eine unbefriedigende Sensitivität mit recht großen Schwankungen zwischen den einzelnen Studien von 43%-71%. Diese lassen sich nur zum Teil erklären, zum einen durch die Qualität des Follow-Up, zum anderen mit der Einordnung der zytologisch unklaren (zweifelhaften und dringend verdächtigen) Fälle zu Test-positiven oder -negativen. Leider kann man bei den meisten dieser Studien keine Aussage über den als Grundlage für das Follow-Up gewählten Referenzstandard machen. Oft ist auch die Art und Weise des Follow-Up ungenau angegeben.

Um dennoch einen Vergleichswert für unsere Auswertung zu haben, wurde der Mittelwert aus allen vorliegenden Studien bestimmt. Danach erhält man in Zusammenschau aller in Tabelle 4 und Tabelle 5 genannten reinen

Pleuraergussstudien im statistischen Mittel für die alleinig morphologiebasierte Zytologie eine Sensitivität von 57,1% und eine Spezifität von 97,1%.

Um von der oben genannten Einordnung der zweifelhaften und dringend verdächtigen zytologischen Diagnosen so weit wie möglich unabhängig zu bleiben, haben wir verschiedene Möglichkeiten der Wertung dieser Diagnosen in die Auswertung mit einbezogen, d.h.:

1. dringend verdächtige und zweifelhafte Zytologien als Test-negativ,
2. dringend verdächtige und zweifelhafte Zytologien als Test-positiv und
3. dringend verdächtige Zytologien als Test-positiv und zweifelhafte Zytologien als Test-negativ.

Nach erfolgter Auswertung aller 1437 Patienten unserer Kohorte erhält man für die Basiszytologie in Auswertungsvariante:

1. (dringend verdächtige und zweifelhafte Zytologien gleich Test-negativ) eine Sensitivität von 49,1% und eine Spezifität von 100% sowie einen positiven prädiktiven Wert (PPW) von 100% und einen negativen prädiktiven Wert (NPW) von 76,9%. Die Gesamttreffer sicherheit liegt hier bei 81,1%.
2. (dringend verdächtige und zweifelhafte Zytologien gleich Test-positiv) eine Sensitivität von 59,8% und eine Spezifität von 94,2%. Der PPW beträgt 86,0%, der NPW 79,9%, die Gesamttreffer sicherheit liegt bei 81,5%.
3. (dringend verdächtige Zytologien gleich Test-positiv und zweifelhafte Zytologien gleich Test-negativ) eine Sensitivität von 55,1% und eine Spezifität von 99,5%. Man erhält hier einen PPW von 98,8%, einen NPW von 78,2% und eine Gesamttreffer sicherheit von 82,2%.

4.3.1 Fazit der verschiedenen Auswertungen über die Treffsicherheit der Basiszytologie

Vergleicht man die Ergebnisse der drei Auswertungsvarianten mit dem statistischen Mittelwert der in Tabelle 4 und Tabelle 5 vorliegenden Studien; so ergibt sich bei Auswertungsvariante 1 (dV/zw= nicht positiv), dass unsere Ergebnisse für die Spezifität um 2,9 Prozentpunkte über und für die Sensitivität 8 Prozentpunkte unter dem Mittelwert der anderen Studien liegen. Die hervorragende Spezifität von 100% bei dieser Auswertungsvariante liegt darin begründet, dass durch die Wertung aller zweifelhaften und dringend verdächtigen Fälle als negativ die Anzahl der falsch positiven Diagnosen auf 0 sank. Dementsprechend sinkt bei dieser Art der Auswertung

die Sensitivität, da nicht nur die richtig positiven Diagnosen zunehmen sondern wichtiger für die Sensitivität auch eine Zunahme der falsch negativen Diagnosen zu verbuchen ist.

In Auswertungsvariante 2 (dV/zw= positiv) liegen unsere Ergebnisse für die Spezifität um 2,9 Prozentpunkte unter, für die Sensitivität um 2,7 Prozentpunkte über dem Mittelwert aus den anderen vorliegenden Studien. Durch die Wertung der dringend verdächtigen und zweifelhaften als positive Fälle fallen sie bei den negativen Diagnosen heraus. Dies bedeutet also einen Zugewinn an positiven Diagnosen. Durch den Anstieg der falsch positiven sinkt gegenüber der Auswertungsvariante 1 die Spezifität auf 94,2%. Andererseits erhalten wir durch die Abnahme an falsch negativen Diagnosen mit 59,8% unser höchstes Ergebnis für die Sensitivität.

Bei unserer dritten Auswertungsvariante (dV= positiv; zw= negativ) liegen unsere Ergebnisse für die Spezifität um 2,4 Prozentpunkte über, die für die Sensitivität um 2 Prozentpunkte unter dem statistischen Mittelwert.

Die in unserer Studie im Vergleich niedrigere Sensitivität kann durch einen restriktiveren Referenzstandard begründet sein oder durch den bloßen Vergleich mit dem statistischen Mittelwert der vorliegenden Studien, wobei wir aber gut im Streubereich liegen.

An den verschiedenen Ergebnissen zur Sensitivität und Spezifität der Basiszytologie in Hinblick auf die Treffsicherheit in der Pleuraergussdiagnostik sieht man, dass die Werte recht stark davon abhängig sind, wie letztendlich mit den nach Basiszytologie unklaren Diagnosen (dringend verdächtigen, zweifelhaften) verfahren wird. So variieren die Ergebnisse je nach Definition für die Sensitivität zwischen 49,1% und 59,8% und die der Spezifität zwischen 94,2% und 100%. Das macht es schwierig, einen konkreten Zahlenwert für die Treffsicherheit der Basiszytologie zu nennen. Allerdings gibt es ein starkes Argument, bei Vorliegen von suspekten Zellen in der Basiszytologie bereits eher an eine maligne Ergussursache zu denken und weitere in der diagnostischen Routinezytologie etablierte adjuvante Methoden zur Abklärung anzuwenden, wie es auch in der täglichen Praxis in der zytopathologischen Abteilung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geschieht. In diesem Fall hat die Basiszytologie den Stellenwert eines Suchtests. Bei unklaren Diagnosen werden zur Bestätigung adjuvante Methoden herangezogen. Es wäre daher am ehesten folgerichtig, die unklaren zytologischen Diagnosen entsprechend einem Suchtest mit ggfls. weiterem Handlungsbedarf als Test-positiv zu werten.

In Zusammenschau der Ergebnisse der verschiedenen Auswertungsvarianten kann man abschließend sagen, dass sich eine klare Tendenz herausgestellt hat, nämlich,

dass die Sensitivität der Basiszytologie nach wie vor bei um die 50% (49%-59%) liegt. Auf der anderen Seite steht demgegenüber eine Spezifität von 94%-100%. Grundsätzlich zeigt damit auch diese Arbeit, dass die Spezifität der Basiszytologie hervorragend ist, die Sensitivität allerdings weiterhin mit etwas mehr als 50% verbesserungswürdig bleibt und sich offenbar an den Möglichkeiten der konventionellen Zytologie nicht viel verändert hat.

Schaut man sich die Ergebnisse der drei Auswertungsvarianten in Bezug auf die Gesamttreffericherheit an, erhält man für alle drei trotz unterschiedlicher Wertung der unklaren Ergüsse (Variante 1: 81,1%, Variante 2: 81,5% und Variante 3: 82,2%) nahezu identische Ergebnisse. So kann man die Aussage treffen, dass die rein morphologiebasierte Zytologie in etwa 81% aller Pleuraergüsse richtig klassifiziert hat. Auch der negative prädiktive Wert für die Basiszytologie ist bei allen drei Auswertungsvarianten ähnlich (Variante 1: 76,9%, Variante 2: 79,9%, Variante 3: 78,2%). Es wurden somit etwa 78% aller gesunden Fälle richtig diagnostiziert. Beim positiven prädiktiven Wert schwanken die Ergebnisse etwas so liegt der Wert zwischen 86,0% (Variante 2) und 100% (Variante 1). Der niedrige Wert in Auswertungsvariante 2 lässt sich durch die Wertung der dringend verdächtigen und zweifelhaften Fälle als Test-positiv erklären, da hierbei ein Anstieg der falsch positiven Fälle auf 52 gegenüber 5 und 0 (Variante 1. und 3.) zu verbuchen ist. Wenn man wie weiter oben schon diskutiert in der Basiszytologie den Stellenwert eines Suchtests sieht, werden die meisten dieser 52 unklaren Fälle noch einer weiterführenden Diagnostik unterzogen. Somit stellt der Großteil der falsch positiven Ergebnisse in dieser Auswertungsvariante nicht die endgültige Diagnose dar. Sieht man von Variante 2 ab, so bietet die rein morphologiebasierte Zytologie in Hinblick auf die zurecht als krank diagnostizierten Fälle mit 98,8% bzw. 100% ein hervorragendes Ergebnis. Dadurch wird deutlich, dass wenn eine positive Diagnose gestellt wird, diese in nahezu 100% zutreffend ist.

4.4 Zugewinn an Treffsicherheit der Zytologie durch adjuvante Methoden

Welchen Zugewinn bietet nun der zusätzliche Einsatz einer adjuvanten Methode in Hinblick auf die Treffsicherheit der Zytologie? Auch hierzu gibt es bereits einige Studien, die dies untersucht haben. Motherby et al. untersuchten 1999 die Treffsicherheit der zytologischen Diagnostik der Ergüsse seröser Körperhöhlen (213 pleurale, 85 peritoneale, 7 perikardiale Ergüsse, 8 Lavagen). Bei 219 zytologisch unklaren Fällen wurde die Sensitivität und Spezifität ermittelt. Diese Fälle wurden

immunzytologisch sowie durch DNA-Bildzytometrie untersucht. Des Weiteren wurde ermittelt, in wie weit eine Kombination beider Methoden das Ergebnis beeinflusst. 110 Fälle wurden mittels einer AgNOR-Analyse bearbeitet. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen in Hinblick auf die Sensitivität und Spezifität der Zytologie sind in Tabelle 6 dargestellt. Fasst man die Ergebnisse zusammen, wurde die ursprüngliche Sensitivität ohne adjuvante Methoden von 53,4% auf 61,0% durch adjuvanten Methoden verbessert, die Spezifität von 93,3% auf 99,0%.

Drei weitere Studien aus den Jahren 2008-2013 von Grefete, Metzgeroth und Yahya untersuchten, inwieweit sich die Treffsicherheit der morphologiebasierten Zytologie durch den Einsatz der Immunzytochemie verbesserte. Grefete kam zu dem Ergebnis, dass durch die Immunzytochemie die Sensitivität von 78% auf 96% und die Spezifität von 73% auf 91% steigt. In der Studie von Metzgeroth 2008 wurde die ursprüngliche Sensitivität der Zytologie durch die Immunzytochemie von 51% auf 93% und die ursprüngliche Spezifität von 92% auf 100% gesteigert. Die aktuellste Studie zu diesem Thema liegt von Yahya aus dem Jahr 2013 vor. Auch hier wurde durch den Einsatz der Immunzytochemie eine Verbesserung der Sensitivität von 77% auf 97% erzielt, die Spezifität blieb bei 100%.

In der vorliegenden Arbeit, die sich allerdings ausschließlich mit Pleuraergüssen beschäftigt, wurden an 92 Patientenproben (63 zweifelhafte, 15 dringend verdächtige, 14 negative), neben der Basiszytologie zusätzlich adjuvante Methoden angewandt. Voraussetzung dafür war, dass dem Zytologen hierfür noch ausreichend Probematerial zur Verfügung stand. Bei allen dieser 92 Fälle wurde eine immunzytologische Untersuchung durchgeführt. Nur in drei Fällen folgten neben der Immunzytologie weitere Untersuchungen, und zwar einmal eine AgNOR-Analyse und einmal eine DNA-Bildzytometrie. Beim dritten Fall wurden neben der Immunzytologie sowohl eine AgNOR-Analyse als auch eine DNA-Bildzytometrie eingeleitet. In allen dieser drei Fälle wurde die richtige Diagnose gestellt. Vor dem Hintergrund, dass die Anzahl der AgNOR-Analysen und DNA-Bildzytometrie nur verschwindend gering ist, beziehen sich die folgenden Aussagen auf die Immunzytochemie.

Entsprechend der in Kapitel 4.3.1 aufgeführten Argumentation ordnen wir zytologisch unklare Befunde als Test-positiv ein, wonach sich wenn möglich, adjuvante Methoden anschlossen. Die Sensitivität nach Anwendung adjuvanter Methoden sinkt von 59,84% auf 57,97%, die Spezifität steigt von 94,25% auf 98,01%. Die Gesamttreffsicherheit steigt durch die adjuvante Methode um 1,67 Prozentpunkte von 81,49% auf 83,16%. Der positive prädiktive Wert von 85,98% (Auswertungsvariante 2) steigt, wie in Kapitel 4.3.1 diskutiert, durch weitere Abklärung der nach Basiszytologie unklaren Diagnosen

auf 94,45%. Der negative prädiktive Wert bleibt mit 79,82% nahezu unverändert im Vergleich zur rein morphologiebasierten Zytologie.

Was bei der Auswertung deutlich herausgestellt werden konnte ist, dass durch den Einsatz der adjuvanten Methoden im Anschluss an die Basiszytologie bei 75% der Patienten die vorher eine zytologisch unklare Diagnose hatten, die richtige Diagnose gestellt werden und in deren Folge eine die Diagnose betreffende klinische Behandlung des Patienten in Angriff genommen werden konnte. Somit wurde der Grund des Einsatzes der adjuvanten Methode, nämlich bei unklaren Ergüsse zu klären, ob ein maligner Tumor vorliegt oder eine andere Erkrankung für den Erguss verantwortlich scheint, beim Großteil der Patienten erreicht.

Das Absinken der Sensitivität liegt an der Wahl unseres Referenzstandards bzw. der Wertung der nach Basiszytologie dringend verdächtigen und zweifelhaften Fälle als positiv. Für die Basiszytologie hatte sich eine Sensitivität von 59,84% ergeben. Durch die adjuvanten Methoden kam jedoch heraus, dass nicht alle dieser zweifelhaften oder dringend verdächtigen Fälle berEP4- oder HEA125-positiv waren und deswegen abschließend negativ beurteilt wurden. Innerhalb der Gruppe der Fälle, die im klinischen Verlauf keinen Tumor aufwiesen, bedeutet dieses eine Steigerung der Spezifität, innerhalb der Gruppe jener Fälle aber, die klinisch doch einen Tumor zeigten, ein Sinken der Sensitivität. In unserem Patientenkollektiv sank die Sensitivität auf 57,97% wohingegen die Spezifität von 94,24% auf 98,01% anstieg.

Setzt man die Grenzen für Positivität anders, so ergäben sich die in Tabelle 19 dargestellten Sensitivität- und Spezifitätswerte.

Tabelle 19 Gegenüberstellung von konventioneller Zytologie und der Kombination aus konventioneller Zytologie und adjuvanten Methoden für die drei unterschiedlichen Auswertemodi

%	Zyto.	Zyto.+adj. Meth.	Zyto.	Zyto.+adj. Meth.	Zyto.	Zyto.+adj. Meth.
	dV/zw= neg		dV/zw= pos		dV=pos ; zw=neg	
Sens.	49,16	53,47	59,84	57,97	52,91	55,35
Spez.	100	100	94,24	98,01	99,44	99,67

Zyto.=Zytologie, adj. Meth.= adjuvante Methode, Sens.= Sensitivität, Spez.=Spezifität,

4.5 Treffsicherheit der adjuvanten Methoden alleine

Schaut man sich die Ergebnisse zur Sensitivität und Spezifität der adjuvanten Methoden alleine an, haben wir eine hervorragende Spezifität von 100% und eine verbesserungswürdige Sensitivität von 65,71%. Die Gesamttreffsicherheit ist mit 85,18% etwas höher wie die der Basiszytologie (81%-82%). Bei den 12 von der Zytologie falsch diagnostizierten Fällen handelt es sich nach erfolgter Basiszytologie um zweifelhafte Befunde. Diese 12 Fälle wurden einer immunzytologischen Untersuchung unterzogen, die für berEP4 und / oder HEA125 negativ verlief, während das spätere Follow-Up jeweils einen Tumor zeigte. Bei diesen Fällen war keine Regelmäßigkeit in Bezug auf den Primärtumor zu erkennen. Am häufigsten lag mit 4 Fällen ein Mammakarzinom vor, gefolgt von einem Bronchialkarzinom mit 3 Fällen. Da berEP4 und HEA125 im Grunde technisch stabile Marker sind, also regelmäßige Färbungen bei Präsenz des Antigens zeigen, gehen wir davon aus, dass auf den immunzytochemisch untersuchten Alkohol-fixierten Präparaten die in der konventionellen Zytologie auf den luftgetrockneten Präparaten gesehenen auffälligen Zellen nicht vorhanden waren. Das grundsätzlich Manko der Immunzytochemie, dass sie an den bei Ergüssen wesentlich zellärmeren Alkohol-fixierten Präparaten durchgeführt werden muss, die nicht primär zur Zytodiagnostik herangezogen werden, lässt sich bislang methodisch nicht beheben; Immunzytochemie an luftgetrockneten gefärbten Präparaten gelingt jedenfalls bislang in der Zytopathologie ganz allgemein nicht verlässlich.

Schaut man sich die Ergebnisse anderer Studien (Motherby 1999, Ko 2001, Gaspar 2008, Trapé 2012, Hsieh 2013) aus den Jahren 1999-2013 an, liegt die Sensitivität der Immunzytochemie zwischen 66,7%-77,8% und die Spezifität zwischen 97%-100%. Vergleicht man die Literaturwerte mit den Ergebnissen in dieser Arbeit, fällt auf; dass ähnliche Werte für die Spezifität ermittelt wurden (100% zu 97%-100%). Dagegen haben wir einen leichten Unterschied bei den Ergebnissen zur Sensitivität (65,71% zu 66,7%-77,8%). Die in der vorliegenden Arbeit vergleichsweise niedrige Sensitivität hängt mit der Wahl unseres Referenzstandards zusammen (Kap.4.7: Definition des Referenzstandards). Da grundsätzlich jeder Pleuraerguss eines Patienten mit im Follow-Up gesichertem malignem Tumor ohne zusätzliche für den Pleuraerguss ursächliche Grunderkrankung als maligne gewertet wurde, sinkt statistisch die Sensitivität.

4.6 Einsatz adjuvanter Methoden zur Tumortypisierung

Neben der Abklärung von unklaren zytologischen Ergebnissen nach initialer Diagnose kommen die adjuvanten Methoden auch bei der Tumortypisierung zum Einsatz. In der vorliegenden Patientenkohorte wurde bei neunzig zytologisch positiven Patienten eine Tumortypisierung mittels adjuvanter Methoden durchgeführt.

Im Vergleich mit dem Follow-Up lag die Zytologie bei der Tumortypisierung in 94,4% der Fälle richtig. In 5,6% der Fälle erfolgte eine falsche Typisierung.

Die folgende Tabelle 20 führt nochmals die entsprechenden Fälle auf.

Tabelle 20 Durch adjuvante Methoden falsch typisierte Fälle

Fall	zytologische Tumortypisierung	zytologische Differentialdiagnose	Tumorart nach Follow-Up
1	Colonkarzinom	Pankreas-/Magenkarzinom	Pleuramesotheliom
2	Ovarialkarzinom		Mammakarzinom
3	Magen-/Pankreaskarzinom	Bronchialkarzinom	Mammakarzinom
4	Colonkarzinom	Magen-/Pankreaskarzinom	Nierenzellkarzinom
5	Bronchialkarzinom		Colonkarzinom

Schaut man sich die fünf falsch typisierten Tumoren an, findet man keine Regelmäßigkeiten. Es handelt sich um zwei Mammakarzinome, ein Pleuramesotheliom, ein Nierenzellkarzinom und ein Colonkarzinom, die falsch typisiert worden sind. Es handelt sich um zwei männliche und drei weibliche Patienten zwischen 37 und 84 Jahre alt. Vier der fünf falsch typisierten Tumore wurden histologisch gesichert bei dem fünften Fall wurde die Tumorart mit Hilfe von bildgebenden Verfahren ermittelt.

Im Folgenden werden die in Tabelle 20 aufgeführten Fälle im Einzelnen diskutiert.

Fall 1: Nach zytologischer Tumortypisierung handelt es sich am ehesten um ein metastasierendes Colonkarzinom (CK 5/6: Score 3; CK 7: Score 1; CK 20: Score 4), differentialdiagnostisch kommt ein Pankreas- oder Magenkarzinom in Frage. Der Colonkarzinommarker (cdx 2) und der Lungenkarzinommarker (TTF-1) zeigten keine Expression (Score 0). Klinisch wurde ein Pleuramesotheliom als Tumor angegeben und durch eine Pleurodese, Chemotherapie und Radiatio behandelt. Über ein Colonkarzinom werden keine Aussagen gemacht. Der Patient verstarb fünf Monate

nach der Erstdiagnose. Zytologisch wurde nicht auf mesotheliale Eigenschaften getestet, sodass man hier nicht die richtige Diagnose stellen konnte.

Fall 2: Zytologisch handelt es sich am ehesten um ein Ovarialkarzinom, klinisch wird ein Mammakarzinom genannt. Die Zytologie kam durch einen Score von 4 beim Ovarialkarzinommarker CA 125 zur Diagnose, wohingegen der Marker für Mammakarzinome Mammoglobin einen Score von 0 hatte. Die Klinik gibt eine pleurale und peritoneale Metastasierung an. Es wurden eine Chemotherapie sowie eine Ablatio durchgeführt. Eine durchgeführte Adenektomie ergab die Diagnose eines peritoneal metastasierten Mammakarzinoms und ein tumorfreies Ovar. Der Primärtumor zeigte zytologisch keine vorhandene Expression bei Mammoglobin und wurde so letztendlich nicht richtig typisiert. Die zytologische Tumortypisierung ist durch die Adenektomie widerlegt. In diesem Fall wurde CA125 von der Zytologie überinterpretiert.

Fall 3: Bei dieser Patientin wurde klinisch ein Mammakarzinom mit pleuraler Metastasierung angegeben und eine Ablatio durchgeführt, bei der das Tumorergebnis histologisch gesichert wurde. Eine geplante Chemotherapie wurde seitens der Patientin abgelehnt. Die immunzytochemischen Ergebnisse und die Markerkonstellation (CK 5/6 Score 3, CK 7 Score 4, CK 20 Score 4, CA125 Score 2; TTF-1 Score 0) sprechen am ehesten, aufgrund der Koexpression der Zytokeratine, für das Vorliegen eines Magen- oder Pankreaskarzinoms. Differentialdiagnostisch kommt ein Lungenkarzinom in Frage. Zur weiteren Abklärung wurden histologische Schnittpräparate angefertigt, auf denen sich ein adenosquamöses Karzinom zeigte, das im Einklang mit dem im ersten Befund differentialdiagnostisch erwogenen Lungenkarzinoms stand. Die Patientin verstarb zwei Wochen nach Erstdiagnose, sodass keine weiteren Diagnosen, die das zytologische Ergebnisse bestätigen bzw. diesem widersprechen, vorliegen. Die Diagnose des Primärtumors bleibt daher unklar. Allerdings wurde in der Zytologie auch kein Mammakarzinommarker eingesetzt.

Fall 4: In diesem Fall wird klinisch ein pulmonal und pleural metastasierendes Nierenzellkarzinom als Primärtumor angegeben, laut Arztbrief röntgenologisch gesichert (C1). Eine Chemotherapie wurde eingeleitet. Die zytologische Markerkonstellation deutet auf ein Karzinom mit intestinaler Differenzierung (cdx2 Score 4) hin. Eine cdx Expression bei Nierenzellkarzinom ist in der Literatur nicht angegeben (Kim, 2014). Die Zytokeratine CK7 und CK20 zeigten beide einen Score von 5, daher die Diagnose der Zytologie, es könnte sich um ein Colonkarzinom handeln. Differentialdiagnostisch kommt ein Magen- oder Pankreaskarzinom in Frage.

Auffällig ist, dass der Nierenzellkarzinommarker (Pax-2) keine Expression zeigte. Histologisch konnte die Diagnose nicht gesichert werden. Daher bleibt auch dieser Fall unklar und gilt nach unserem Referenzstandard als falsch typisiert.

Fall 5: Hier liegt klinisch ein Colonkarzinom vor, welches hepatische und pleurale Metastasen ausgebildet hat. Als Therapie wurden nach Operation eine Chemotherapie und eine Pleurodese vorgenommen. Immunzytochemisch sprechen die Ergebnisse für ein metastasierendes Lungenkarzinom bei folgender Markerkonstellation TTF-1 Score 3, CA125 Score 4, CK 7 Score 5, CK5/6 und CK20 Score 0. Gegen ein Colonkarzinom sprechen ein Score von 0 sowohl bei CK5 und CK20. Auch der Colonkarzinommarker cdx-2 zeigte keine Expression. Da allerdings ein Colonkarzinom histologisch gesichert ist und ein Lungenkarzinom im Follow-Up nicht als Zweitumor diskutiert wurde liegt in diesem Fall im Sinne des Referenzstandards eine falsche Typisierung des Primärtumors vor.

Pomjanski et. al 2005 geben eine Genauigkeit von 85,1% bei der Identifizierung des Primärtumors an. Schaut man sich weitere Studien zu diesem Thema an, so liegt die Treffsicherheit der Tumortypisierung bei unbekanntem Primarius zwischen 67-76% (DeYoung und Wick 2000, Lagendijk 1998, Rubin 2001, Krüger 1992). Die unterschiedlichen Werte kann man durch den Umgang mit den angebotenen Differentialdiagnosen erklären. So war es bei uns der Fall, dass ein Tumor auch dann als richtig klassifiziert gewertet wurde, wenn die vom diagnostizierenden Arzt zusätzlich gestellte Differentialdiagnose mit dem im Follow-Up befundeten Tumor übereinstimmte. Nimmt man nur die Erstdiagnosen ohne Differentialdiagnosen, so liegt die Treffsicherheit bei 86,7%.

Abschließend kann man zur Tumortypisierung der Zytologie mit Hilfe adjuvanter Methoden sagen, dass beim Großteil (94,4%) der Fälle die Tumorzellen dem richtigen Primarius zugeordnet wurden, sodass der Kliniker die richtige Diagnose erhielt. Der Einsatz adjuvanter zytologischer Methoden an Pleuraergüssen bietet eine willkommene Hilfe bei der Primariussuche in der Tumordiagnostik. Die histogenetisch richtige Diagnose des Primärtumors ist für therapeutische Belange im Rahmen von immer mehr diversifizierten, viel genauer auf den jeweiligen Tumor abgestimmten Therapien essentiell. Es werden den Patienten belastende Fehlbehandlungen und den Krankenkassen Kosten für eine mögliche falsche Therapie erspart.

4.7 Definition des Referenzstandards

Bei der Festlegung der Kriterien für einen malignen oder benignen Pleuraerguss (positiver oder negativer Referenzstandard), standen wir ebenso wie andere Untersucher (diskutiert in Motherby et al., 1999) vor dem Problem, dass das klinische Follow-Up, also das Handeln des Kliniklers und seine endgültige Diagnose, grundsätzlich von der zytologischen Diagnose beeinflusst wird, also nicht unabhängig hiervon ist.

Die Zytologie wird als wenig invasive und kostengünstige Methode, mit möglicher ambulanter Probeentnahme, bei gleichzeitig hoher Spezifität als Routineuntersuchung in der Diagnostik von Pleuraergüssen angewandt. Sie bildet zur Zeit den Goldstandard für die Ergussdiagnostik. Nur selten wird aufgrund des hohen Aufwandes und der anzunehmenden höheren Komplikationsrate die Histologie als alternative Methode zur Zytologie nach thorakoskopischer Probenentnahme aus Pleura parietalis oder Pleura thoracalis eingesetzt. Eine Indikation für diese, einen stationären Aufenthalt erfordernde Methodik ist im Grunde nur ein dringender Verdacht auf ein solches malignes Geschehen, das auch durch eine erweiterte Bildgebung (CT, Bronchoskopie) nicht geklärt werden kann (Baenkler und Fritze, 1999). Daher wurde auch bei der vorliegenden Patientenkohorte nur bei wirklich zwingendem Verdacht auf eine Pleurakarzinose neben der Zytologie noch zusätzlich eine Histologiegewinnung der Pleura mittels Thorakoskopie vorgenommen.

Ziel musste es also sein, den Referenzstandard so zu formulieren, dass der Einfluss der Zytologie auf das Ergebnis des klinischen Follow-Up so weit wie möglich minimiert wurde. So hielten wir den Referenzstandard zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der Zytologie eher allgemein. Alle Patienten mit bekanntem malignem Tumor, die sonst keine weitere für den Pleuraerguss als Ursache in Frage kommende benigne Grunderkrankung besaßen, d.h. laut Follow-Up nur der maligne Tumor als Ergussursache in Frage kam, erfüllten die Kriterien für den positiven Referenzstandard. Grundgedanke dabei war, dass trotz der in Kapitel 4.2 diskutierten unterschiedlichen Häufigkeiten grundsätzlich jeder maligne Tumor in die Pleura metastasieren kann, man also dem betroffenen Patienten keinen negativen Referenzstandard zuordnen kann. Ausnahmen für diese Regelung waren (semi-)maligne Tumore, wie z.B. das Basaliom, welches normalerweise nicht metastasiert (Moll, 2005). Der Vorteil dieses Referenzstandards liegt klar darin, dass der Einfluss der Zytologie auf das Follow-Up soweit wie möglich reduziert wurde. Als Nachteil sinkt statistisch jedoch die Sensitivität

der Zytologie, da grundsätzlich jeder Pleuraerguss eines Patienten mit im Follow-Up gesichertem malignem Tumor ohne zusätzliche für den Pleuraerguss ursächliche Grunderkrankung als maligne gewertet wurde. In der Realität dürfte die tatsächliche Metastasierungsrate in die Pleura aber aus oben genannten Gründen unüberprüfbar niedriger liegen.

Neben der Zytologie selbst hängt die Treffsicherheit in der Ergussdiagnostik auch vom Pathologen bzw. vom Kliniker ab. Fehlerquellen liegen zum einem beim Pathologen, wenn diagnostisch entscheidende Zellen übersehen oder zwar gesehen, aber letztlich falsch interpretiert worden sind. Schätzungen zufolge sind 1/3 der falsch negativen Diagnosen auf solche Beobachtungsfehler (Screening Error) zurückzuführen. Zum anderen liegt die Fehlerquelle beim Kliniker, also den eingesandten Proben, z.B. durch Fehler bei der Probeentnahme, einem falschen Punktionsort oder falscher Fixierung der entnommenen Probe (Sampling Error), sodass in 2/3 dieser Fälle die nachfolgende zytologische Evaluierung unmöglich ist (Motherby et. al, 1998).

Die Verantwortung, dass genügend Material aufgearbeitet wird, liegt auf Seiten des Pathologen. Daher gründet sich die Diagnostik in der Zytopathologie der Heinrich-Heine-Universität auf mindestens drei Sedimentausstriche (à 24 x 60 mm Fläche), welche um weitere Ausstriche ergänzt werden können. Es gibt allerdings auch Pathologien, die ihre Diagnostik auf zwei oder drei zellulär möglicherweise aber höher angereicherte Zytozentrifugate à 12 mm Durchmesser beschränken.

Mit dem negativen Referenzstandard wurde ähnlich verfahren. So wurden alle Patienten als negativ eingestuft, die mindestens eine der in Abbildung 1 (Kap.1.2.2) aufgeführten benignen, potentiell zu einem Pleuraerguss führenden Grunderkrankungen aufwiesen und gleichzeitig zum Zeitpunkt des Pleuraergusses und mindestens zwei Monate danach nicht an einem malignen Tumor erkrankt waren.

Fälle, die so nicht direkt einem der beiden Standards zugeordnet werden konnten, fielen in eine dritte Kategorie, d.h. sie wiesen einen malignen Tumor auf, hatten aber auch gleichzeitig eine entsprechende benigne Grunderkrankung, die zu dem Pleuraerguss geführt haben könnte. Diese Patienten wurden nochmals einzeln gesichtet. Wir haben hierfür eine Art Entscheidungsbaum entworfen, der besagte, dass neben Grunderkrankung und Tumor im Follow-Up Zeitraum eine entsprechende Klinik (v.a. Bildgebung) vorliegen musste, die beim einsendenden Kliniker zum Ausschluss oder zur Diagnose eines malignen Pleuraergusses geführt hatte. Ein Großteil dieser Patienten wurde jedoch dennoch als unklar aus der Bewertung herausgenommen, da

man letztendlich auf Grund der vorliegenden Follow-Up Daten weder dem Tumor, noch der Grunderkrankung den Pleuraerguss klar zuordnen konnte.

4.8 Schlussfolgerung

Die Zytologie ist heute die Methode der Wahl bei der Diagnostik klinisch unklarer Pleuraergüsse. Mindestens jeder Erst-Erguss der Pleura sollte zur weiteren Abklärung in die Zytologie geschickt werden, da in knapp 38% der Fälle eine maligne Grunderkrankung dem Erguss als Ursache zu Grunde liegt. Mit 57,97% Sensitivität wird zwar nur etwas mehr als die Hälfte der malignen Tumore erkannt, dafür ist aber das Auftreten von falsch positiven Diagnosen selten (98,01% Spezifität). Die im Literaturvergleich etwas niedrigere Spezifität ist im Wesentlichen durch die Wertung von nicht weiter mit adjuvanten Methoden abzuklärenden zytologisch unklaren Ergüssen als statistisch Test-positiv zu erklären. Somit kann die Behandlung bei immerhin 22% der Pleuraergüsse auf deren maligne Ursache ausgerichtet werden, ohne dabei jene Patienten zu gefährden, deren Pleuraerguss eine nicht maligne Ursache hat.

Der Einsatz adjuvanter Methoden klärt 75% der zytologisch unklaren Befunde ab. Es werden eindeutig tumorpositive oder -negative abschließende zytologische Diagnosen gestellt. Des Weiteren liefern sie dem Kliniker nach positiver zytologischer Diagnose mit einer korrekten Tumortypisierung in über 94% der Fälle einen guten Anhaltspunkt bei der weiteren Primariussuche.

5 Literaturverzeichnis

Abouzgheib, W., Bartter, T., Dagher, H., Pratter, M., Klump, W., 2009. A prospective study of the volume of pleural fluid required for accurate diagnosis of malignant pleural effusion. *Chest*. 2009 Apr;135(4):999-1001.

Antony, V.B., Loddenkemper, R., Astoul, P., Boutin, C., Goldstraw, P., Hott, J., Rodriguez Panadero, F., Sahn, S.A., 2001. Management of malignant pleural effusions. *Eur. Respir. J.* 2001 Aug, 18(2): 402–19.

Antunes, G., Neville, E., Duffy, J., Ali, N., 2003. BTS guidelines for the management of malignant pleural effusions. *Thorax*. 2003 May, 58 Suppl 2, ii29–38.

Baenkler, H.-W., Fritze, D., 1999. *Innere Medizin, Duale Reihe*. Hippokrates-Verlag im Thieme-Verlag, Stuttgart.

Barbetakis, N., Antoniadis, T., Tsilikas, C., 2004. Results of chemical pleurodesis with mitoxantrone in malignant pleural effusion from breast cancer. *World J Surg Oncol*. 2004 May 20;2:16.

Bedrossian, C.W.M., 1994. *Malignant Effusions: A Multimodal Approach to Cytologic Diagnosis*. Igaku-Shoin, New York and Tokyo.

Biesterfeld, S., Gerres, K., Fischer-Wein, G., Böcking, A., 1994. Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol*. 1994 Jan;47(1):38-42.

Biesterfeld S, Pomjanski N, Schramm M. Adjuvante Methoden in der diagnostischen Zytopathologie. *VerhDtsch Ges Zyt* (2013), 28: 8-16

Böcking, A., 1998. Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Pathologe* 1998, 19(3), 253-258.

Bubendorf, L., Feichter, G.E., Obermann, E.C., Dalquen, P., 2010. *Pathologie: Zytopathologie*, 3rd ed. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Bühring, P., 2008. Geschlechtsspezifische Aspekte des Rauchens: Höheres Lungenkrebsrisiko für Frauen. Deutsches Ärzteblatt. 2008, Jg.105, A 2505.

Cajulis, R.S., Haines, G.K., 3rd, Frias-Hidvegi, D., McVary, K., Bacus, J.W., 1995. Cytology, flow cytometry, image analysis, and interphase cytogenetics by fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of transitional cell carcinoma in bladder washes: a comparative study. *Diagn Cytopathol.*1995 Oct; 13(3):214-23; discussion 224.

Chernow, B., Sahn S.A., 1977. Carcinomatous involvement of the pleura. *Am J Med.*1977 Nov; 63(5):695-702.

Churg, A., Cagle, P.T., Roggli, V.L., 2006. Tumors of the serosal membranes (Atlas of Tumor Pathology Series 4th). 1st ed. American Registry of Pathology; Washington DC.

Cibas, E.S., 1995. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. *Diagn Cytopathol.*1995 Aug; 13(2):166-71.

Cohen, C., 1996. Image cytometric analysis in pathology. *Hum Pathol.*1996 May; 27(5):482-93.

Contractor, K.B., Kaur, K., Rodrigues, G.S., Kulkarni, D.M., Singhal, H., 2008. Male breast cancer: is the scenario changing. *World J Surg Oncol.* 2008 Jun 16;6:58.

Daniel, T.M., Tribble, C.G., Rodgers, B.M., 1990. Thoracoscopy and talc poudrage for pneumothoraces and effusions. *Ann Thorac Surg.*1990 Aug; 50(2):186-9.

Dennis, E., Barry, 2008. Educational Review Manual in Pulmonary Disease. 3rd ed. Castle Connolly Graduate Medical Publishing, Ltd.; New York

DeYoung, BR., Wick, MR., 2000. Immunohistologic evaluation of metastatic carcinomas of unknown origin: An algorithmic approach. *Semin Diagn Pathol.*2000 Aug; 17(3):184-93.

Ehya, H., 1986. The cytologic diagnosis of mesothelioma. *Semin Diagn Pathol.*1986 Aug; 3(3):196-203.

Fentiman, I.S., Millis, R., Sexton, S., Hayward, J.L., 1981. Pleural effusion in breast cancer: a review of 105 cases. *Cancer*.1981 Apr 15;47(8):2087-92.

Feulgen, R., Rossenbeck, H., 1924. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 1924; 135: 203-248

Gaspar, M.J., De Miguel, J., García Díaz, J.D., Díez M., 2008. Clinical utility of a combination of tumour markers in the diagnosis of malignant pleural effusions. *Anticancer Res*.2008 Sep-Oct; 28(5B):2947-52.

Gasparri, R., Leo, F., Veronesi, G., De Pas, T., DePas, T., Colleoni, M., Maisonneuve, P., Pelosi, G., Galimberti, V., Spaggiari, L., 2006. Video-assisted management of malignant pleural effusion in breast carcinoma. *Cancer*.2006 Jan 15; 106(2):271-6.

Gerok, W., 2007. *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*, 11th ed. Schattauer Verlag, Stuttgart.

Grefte, J.M., de Wilde, P.C., Salet-van de Pol, M.R., Tomassen, M., Raaymakers-van Geloof, W.L., Bulten, J., 2008, Improved identification of malignant cells in serous effusions using a small, robust panel of antibodies on paraffin-embedded cell suspensions. *Acta Cytol*.2008 Jan-Feb; 52(1):35-44.

Gupta, S., Sodhani, P., Jain S., 2012 Cytomorphological profile of neoplastic effusions: an audit of 10 years with emphasis on uncommonly encountered malignancies. *J Cancer Res Ther*. 2012 Oct-Dec; 8(4):602-9.

Gushchin, V., Demmy, T.L., Kane, J.M., 3rd, 2007. Surgical management of metastatic peritoneal or pleural disease. *Semin Oncol*.2007 Jun; 34(3):215-25.

Haam, E.V., 1977. *Cytology of transudates and exudates*. S. Karger, Basel.

Hallman, J.R., Geisinger, K.R., 1994. Cytology of fluids from pleural, peritoneal and pericardial cavities in children. A comprehensive survey. *Acta Cytol*. 1994 Mar-Apr; 38(2):209-17.

Haroske, G., Baak, J.P., Danielsen, H., Giroud, F., Gschwendtner, A., Oberholzer, M., Reith, A., Spieler, P., Böcking, A., 2001. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol.*2001; 23(2):89-95.

Hartman, D.L., Gaither, J.M., Kesler, K.A., Mylet, D.M., Brown, J.W., Mathur, P.N., 1993. Comparison of insufflated talc under thoracoscopic guidance with standard tetracycline and bleomycin pleurodesis for control of malignant pleural effusions. *J Thorac Cardiovasc Surg.*1993 Apr; 105(4):743-7; discussion 747-8.

Hausheer, F.H., Yarbrow, J.W., 1985. Diagnosis and treatment of malignant pleural effusion. *Semin Oncol.*1985 Mar; 12(1):54-75.

Hentrich, M., Hartenstein, R., 1997. Behandlung maligner Körperhöhlenergüsse. *Internist (Berl).* 1997 Aug;38(8):794-804.

Howlander, N., Noone, A.M., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Altekruse, S.F., Kosary, C.L., Ruh, I. J., Tatalovich, Z., Cho, H., Mariotto, A., Eisner, M.P., Lewis, D.R., Chen, H.S., Feuer, E.J., Cronin, K.A. (eds) 2011. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)*,

Hsieh, T.C., Huang, W.W., Lai, C.L., Tsao, S.M., Su, C.C.,2013. Diagnostic value of tumor markers in lung adenocarcinoma-associated cytologically negative pleural effusions. *Cancer Cytopathol.* 2013 Sep; 121(9):483-8.

Hsu, C., 1987. Cytologic detection of malignancy in pleural effusion: a review of 5255 samples from 3811 patients. *Diagn Cytopathol.* 1987 Mar; 3(1):8-12.

Johnson, T.M., Kuffel, D.G., Dewald, G.W., 1996. Detection of hyperdiploid malignant cells in pleural effusions with chromosome-specific probes and fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc.*1996 Jul; 71(7):643-8.

Johnston, W.W., 1985. The malignant pleural effusion. A review of cytopathologic diagnoses of 584 specimens from 472 consecutive patients. *Cancer.*1985 Aug 15; 56(4):905-9.

Kim, M.Y., 2014. Napsin A is a useful marker for metastatic adenocarcinomas from the lungs. *Histopathology* 2014 Jan 31. doi: 10.1111/his.12383. (Epub ahead of print)

Ko, E.C., Jhala, N.C., Shultz, J.J., Chhieng DC., 2001. Use of a panel of markers in the differential diagnosis of adenocarcinoma and reactive mesothelial cells in fluid cytology. *Am J Clin Pathol.* 2001 Nov; 116(5):709-15.

Krüger, R., de Leon, F., Maihoff, J., 1992. Der Wert der Immunhistochemie in der histologischen Routinediagnostik von Metastasen unbekannter Primärtumoren. *Pathologe.* 1992 Apr; 13(2):65-72.

Lagendijk, JH., Mullink, H., Van Diest, PJ., Meijer, G., Meijer, CJLM, 1998. Tracing the origin of adenocarcinomas with unknown primary using immunohistochemistry. *Hum Pathol.* 1998 May; 29(5):491-7.

Leckie, W.J., Tothill, P., 1965. Albumin turnover in pleural effusions. *Clin Sci.* 1965 Oct; 29(2):339-52.

Light, R.W., 2002. Pleural Effusion. *N Engl J Med.* 2002 Jun 20;346(25):1971-7.

Lopes-Cardoso, P., 1966. A critical evaluation of 3000 cytologic analyses of pleural fluid, ascitic fluid, and peritoneal fluid. *Acta Cytol* 1966, 10, 455–60.

Metzgeroth, G., Kuhn, C., Schultheis, B., Hehlmann, R., Hastka, J., 2008. Diagnostic accuracy of cytology and immunocytology in carcinomatous effusions. *Cytopathology.* 2008 Aug; 19(4):205-11. Epub 2007 Jun 16.

Moll, I., 2005. *Dermatologie*, 6th ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Moll, K.-J., Moll, M., 2006. *Anatomie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog 1.* Elsevier, Urban&Fischer Verlag, München

Motherby, H. *Adjuvante Untersuchungsmethoden zur Verbesserung der Treffsicherheit der Ergusszytologie.* Med. Habil., Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1999

Motherby H, Nadjari B, Friegel P, Kohaus J, Ramp U, Böcking, 1999 A: Diagnostic accuracy of effusion cytology. *Diagn Cytopathol.* 1999 Jun; 20(6):350-7.

Motherby, H., Nadjari, B., Remmerbach, T., Marcy, T., Pomjanskaja, N., Müller, W., Knops, K., Häussinger, D., Strauer, B.E., Böcking, A., 1998. Static DNA cytometry as a diagnostic aid in effusion cytology: II. DNA aneuploidy for identification of neoplastic cells in equivocal effusions. *Anal Quant Cytol Histol.* 1998 Jun; 20(3):162-8.

Mouriquand, C., Augusseau, S., Mouriquand, J., Breyton, M., 1977. Quelques aperçus sur le méthodes d'études actuelles de la cytology pleurale. *Rev Fr Mal Respir* 1977; 5:113.

Murken, J., 2006. *Humangenetik*, 7th ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Natanzon, A., Kronzon, I., 2009. Pericardial and pleural effusions in congestive heart failure-anatomical, pathophysiologic, and clinical considerations. *Am J Med Sci.* 2009 Sep; 338(3):211-6.

Neragi-Miandoab, S., 2008. Surgical and other invasive approaches to recurrent pleural effusion with malignant etiology. *Support Care Cancer.* 2008 Dec; 16(12):1323-31

Noppen, M., De Waele, M., Li, R., Gucht, K.V., D'Haese, J., Gerlo, E., Vincken, W., 2000. Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Sep; 162(3 Pt 1):1023-6.

Onofre, FB., Onofre, AS., Pomjanski, N., Buckstegge, B., Grote, HJ., Böcking, A., 2008. 9p21 Deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma in serous effusions additional to immunocytochemistry, DNA-ICM, and AgNOR analysis. *Cancer.* 2008 Jun 25; 114(3):204-15.

Pokieser, L., Bernhardt, K., Kreuzer, A., Schalleschak, J., 2001. *Klinische Zytologie der Lunge und Pleura: Handbuch und Farbatlas.* Springer Verlag, Wien.

Pomjanski, N., Motherby, H., Buckstegge, B., Knops, K., Rohn, BL., Böcking, A., 2001. Early diagnosis of mesothelioma in serous effusions using AgNOR analysis. *Anal Quant Cytol Histol.* 2001 Apr, 23(2):151-60.

Pomjanski, N., Grote, HJ., Doganay, P., Schmiemann, V., Buckstegge, B., Bocking, A., 2005. Immunocytochemical identification of carcinomas of unknown primary in serous effusions. *Diagn Cytopathol.* 2005 Nov; 33(5):309-15.

Remmele, W., 1999. *Rechtsfragen in der Pathologie.: Einführung in die bioptische Diagnostik. Herz und Gefäßsystem. Hämatologie. Milz. Thymus.* Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Rieger, C., 2004. *Pädiatrische Pneumologie 2.Auflage,* Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Riley, R.S., Mahin, E.J., (M.S.), W.R., 1993. *Clinical applications of flow cytometry.* Igaku-Shoin, New York and Tokyo.

Rohn, B.-L. Verbesserung der Treffsicherheit der Ergusszytologie mittels AgNOR-Analyse als adjuvante Untersuchungsmethode. *Med. Diss., Heinrich Heine-Universität Düsseldorf,* 2004

Rubin, BP., Skarin, AT., Pisick, E., Rizk, M., Salgia, R., 2001. Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2001 Feb; 10(1):77-82.

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.): *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends.* 7. Ausgabe, Berlin, 2010

Sallach, SM., Sallach, JA., Vasquez, E., Schultz, L., Kvale, P., 2002. Volume of pleural fluid required for diagnosis of pleural malignancy. *Chest.* 2002 Dec; 122(6):1913-7.

Salyer, WR., Eggleston, JC., Erozan, YS., Efficacy of pleural needle biopsy and pleural fluid cytopathology in the diagnosis of malignant neoplasm involving the pleura. *Chest.* 1975 May; 67(5):536-9.

Sears, D., Hajdu, S.I., 1987. The cytologic diagnosis of malignant neoplasms in pleural and peritoneal effusions. *Acta Cytol.* 1987 Mar-Apr; 31(2):85-97.

Spriggs, A.I., Boddington, M.M., 1968. The Cytology of Effusions: Pleural, Pericardial, and Peritoneal and of Cerebrospinal Fluid, 2nd ed. W. Heinemann, London.

Spriggs, A.I., Boddington, M.M., 1989. Atlas of Serous Fluid Cytopathology (Current Histopathology), Springer Netherlands

Statistisches Bundesamt, 2010. Mikrozensus 2009 - Fragen zur Gesundheit - Rauchgewohnheiten der Bevölkerung 2009. Wiesbaden.

Stewart, P.B., 1963. The rate of formation and lymphatic removal of fluid in pleural effusions. *J Clin Invest.* 1963 Feb; 42:258-62.

Thomsen, T.W., DeLaPena, J., Setnik, G.S., 2006. Videos in clinical medicine. Thoracentesis. *N Engl J Med.* 2006 Oct 12; 355(15):e16.

Trapé, J., Molina, R., Sant, F., Montesinos, J., Arnau, A., Franquesa, J., Blavia, R., Martín, E., Marquilles, E., Perich, D., Pérez, C., Roca, J.M., Doménech, M., López, J., Badal, J.M., 2012 Diagnostic accuracy of tumour markers in serous effusions: a validation study. *Tumour Biol.* 2012 Oct; 33(5):1661-8.

Trappl, R., Trost, H., 2010. Wissenschaft und Medizin: Ein Lehrbuch für das erste Spezielle Studien Modul (SSM1). Facultas Verlag.

Travis, W.D., 2004. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC.Press, Lyon

Tschopp, J.M., Brutsche, M., Frey, J.G., 1997. Treatment of complicated spontaneous pneumothorax by simple talc pleurodesis under thoracoscopy and local anaesthesia. *Thorax.* 1997 Apr; 52(4):329-32.

Utine, G.E., Ozcelik, U., Kiper, N., 2009. Pediatric pleural effusions: etiological evaluation in 492 patients over 29 years. *Turk J Pediatr.* 2009 May-Jun; 51(3):214-9.

Walker-Renard, P.B., Vaughan, L.M., Sahn, S.A., 1994. Chemical pleurodesis for malignant pleural effusions. *Ann Intern Med.* 1994 Jan 1; 120(1):56-64.

Yahya, Z.M., Ali, H.H., Hussein, H.G., 2013. Evaluation of the sensitivity and specificity of immunohistochemical markers in the differential diagnosis of effusion cytology. Oman Med J. 2013 Nov; 28(6):410-6.

Danksagung

Mein besondere Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Biesterfeld, Leiter des Funktionsbereich Cythopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Überlassung des Themas und die stetige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Vielen Dank für die vielen konstruktiven Besprechungen und Gespräche, die wir während meiner Doktorarbeit geführt haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Martin Schramm, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Vielen Dank an meinen guten Freund Herrn Dipl. Biologe Peter Ilse für die virtuelle Umsetzung des Fragebogens und deine immer währende Diskussionsbereitschaft.

Für Ihre tatkräftige Unterstützung gilt mein Dank des Weiteren allen Mitarbeitern des Instituts für Cytopathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Abschließend danke ich meinen Eltern Hannelore und Detlef Fink, die mir bei meiner gesamten Ausbildung stets mit Unterstützung und Feuereifer zur Seite standen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

06.09.2014 Christian Fink